

Aus der Medizinischen Klinik
mit Schwerpunkt Hämatologie und Onkologie
der Medizinischen Fakultät der Charité - Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

Identifizierung und Charakterisierung eines neuen Clusters von T-Zell-Rezeptor Delta- Rekombinationselementen

Zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät der Charité -
Universitätsmedizin Berlin

von
Jens Wanzeck
aus Berlin

Dekan: Prof. Dr. med. Martin Paul

Gutachter: 1. Prof. Dr. med. C. A. Schmidt
 2. Prof. Dr. R. Walther
 3. PD Dr. H. Oettle

Datum der Promotion: 18.07.2005

Abstrakt

Es konnte ein neuer Cluster von insgesamt sieben T-Zell-Rezeptor δ -Rekombinationselementen (δ Rec2.1-2.7), welcher sich innerhalb des *TCRD*-Gens, 2,6-5,2 kb downstream des variablen Gensegments *V δ 2*, befindet. Gezeigt wurde, dass diese isolierten *recombination signal sequences* sowohl mit *D δ 3*- als auch mit *J δ 1*-Segmenten des *TCRD*-Gens und *pseudo joining*-Gensegmenten des *TCRA*-Gens rearrangiert werden. Rearrangements, die δ Rec2-Elemente enthielten, wurden in allen zehn Proben peripherer Leukozyten gesunder Spender gefunden, obwohl sie hundertfach seltener sind als klassische δ Rec-Rearrangements. Die absolute Frequenz der δ Rec2-Rearrangements in PB-T-Zellen war, verglichen mit der in Thymozyten, niedriger, was nahe legt, dass sie während der T-Zell-Entwicklung deletiert werden. Am auffälligsten war das Verschwinden von δ Rec2-*D δ 3*-Umlagerungen, deren Häufigkeit in PB-T-Zellen elffach niedriger als in Thymozyten war. Die überwiegende Mehrheit der δ Rec2-*J δ 1*-Rearrangements enthielt das *D δ 3*-Element an der Verknüpfungsstelle. Dies bedeutet, dass sie sich aus δ Rec2-*D δ 3*-Rearrangements entwickelt haben könnten. Im Gegensatz dazu steht, dass die Mehrheit der δ Rec2- ψ *J α* -Umlagerungen kein *D δ 3*-Segment enthielt, was vermutlich daher rührt, dass sie Einschnitt-Rearrangements darstellen. Die Umlagerungen δ Rec2-*J δ 1*-und δ Rec2- ψ *J α* scheinen T-Zell-spezifisch zu sein, δ Rec2-*D δ 3*-Rearrangements hingegen wurden auch in B-Lymphozyten und NK-Zellen in geringer Zahl nachgewiesen. Zusammenfassend zeigen diese Daten, dass δ Rec2-Rearrangements wahrscheinlich vorübergehende Schritte des Rekombinationsprozesses des *TCRAD*-Lokus sind und durch nachfolgende *V α -J α* -Rearrangements deletiert werden können. Ähnlich wie die klassischen δ Rec-Umlagerungen, spielen vermutlich auch δ Rec2-Rearrangements eine Rolle auf dem Wege der Differenzierung von T-Lymphozyten hin zur reifen TCR $\alpha\beta$ -Zelle. Somit könnten die hier erstmals beschriebenen weiteren Rekombinationselemente in der MRD-Diagnostik maligner lymphatischer Erkrankungen die bisher genutzten Rearrangements ergänzen und ebenso als Verlaufsmarker genutzt werden.

Schlagwörter: Rearrangement, *TCRD*, *deltaRec2*, *Ddelta3*, *Jdelta1*, *pseudoJalpha*, Thymozyten, T-Zellen

Abstract

A new cluster of 7 T-cell receptor δ recombining elements (δ Rec2.1-2.7) located within the T-cell receptor δ (TCRD) gene, 2.6-5.2 kb downstream from the variable region (V δ 2) gene segment could be identified. The δ Rec2 elements are isolated recombination signal sequences to rearrange with the D δ 3, J δ 1 segments of the TCRD gene as well as with the pseudo joining segment of the TCRA gene. Rearrangements involving the δ Rec2 elements were found in all peripheral blood (PB) samples from 10 healthy individuals, although their frequency was about 100-fold lower than classical δ Rec rearrangements. Compared with thymocytes, the total frequency of δ Rec2 rearrangements was lower in PB T-cells, suggesting that they are deleted during T-cell development. The decrease in frequency of the δ Rec2-D δ 3 rearrangements was most striking: 11 times lower in PB T lymphocytes than in thymocytes. Since the δ Rec2-J δ 1 rearrangements contained the D δ 3 segment in the junctional region, it could be assumed that they are derived from the δ Rec2-D δ 3 rearrangements. In contrast, the majority of δ Rec2- ψ J α rearrangements did not contain the D δ 3 segment, indicating that they are single step rearrangements. The δ Rec2-J δ 1 and δ Rec2- ψ J α rearrangements seem to be T-lineage specific, but the δ Rec2-D δ 3 rearrangements were also found at very low frequencies in B-lymphocytes and NK-cells. The results suggest that δ Rec2 rearrangements are transient steps in the recombinatorial process of the TCRAD locus and are probably deleted by subsequent V α -J α rearrangements. Similarly to the classical δ Rec rearrangements, also the δ Rec2 rearrangements most likely play a role in T-cell differentiation towards the TCR $\alpha\beta$ lineage. These recombination elements could also complete the rearrangements used so far as marker in diagnosis of minimal residual disease of malignant lymphatic diseases.

Keywords: rearrangement, TCRD, δ Rec2, D δ 3, J δ 1, ψ J α , thymocytes, T-cells

Inhaltsverzeichnis

INHALTSVERZEICHNIS.....	3
ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS.....	5
1 EINLEITUNG	7
1.1 DAS IMMUNSYSTEM.....	7
1.2 T-ZELL-REIFUNG UND -ENTWICKLUNG	8
1.3 TCR-REARRANGEMENT/V(D)J-REKOMBINATION.....	10
1.4 TCRD-DELETION ALS ZWISCHENSCHRITT DER ENTWICKLUNG ZUR REIFEN α/β -T-ZELLE	14
1.5 BEDEUTUNG DES NACHWEISES VON KLONSPEZIFISCHEN UMLAGERUNGEN ZUR DIAGNOSTIK BEI MRD..	15
2 MATERIAL UND METHODEN.....	18
2.1 MATERIAL	18
2.1.1 Patientenkriterien und Probengewinnung.....	18
2.1.2 Primer- und Sondendesign	19
2.1.3 Soft- und Hardware	23
2.2 METHODEN.....	24
2.2.1 Aufreinigung der Leukozytensubpopulationen durch Fluorescence activated cell sorting (FACS)	24
2.2.2 Dextran-Separierung.....	24
2.2.3 DNA-Extraktion.....	25
2.2.4 DNA-Konzentrationsbestimmung	26
2.2.5 Das Prinzip der konventionellen PCR.....	26
2.2.6 Echtzeit-Fluoreszenz-PCR via TaqMan	27
2.2.7 Die Multiplex-nested-PCR.....	30
2.2.8 Nachweis der PCR-Produkte.....	32
2.2.9 Sequenzierung der PCR-Produkte.....	32
2.2.10 Statistische Verfahren.....	33
3 ERGEBNISSE	34
3.1 UNTERSUCHUNG VON δ REC2-REARRANGEMENTS UND DEREN QUANTIFIZIERUNG	34
3.1.1 Identifikation des δ Rec2.1-2.7-Clusters.....	34
3.1.2 Analyse via Real-Time-PCR.....	35
3.1.2.1 Erstellung und Nachweis der Standardreihen.....	35
3.1.2.2 Probenmessungen.....	39
3.1.2.3 Fazit der Messungen mittels Echtzeit-PCR	40
3.1.3 Analyse via Multiplex-nested-PCR.....	41
3.1.3.1 Rearrangements der δ Rec2.1-2.7-Elemente in peripheren Leukozyten.....	41

3.1.3.2	Quantifizierung der δ Rec2.1-2.7-Rearrangements	44
3.2	REARRANGEMENTS DER δ REC2.1-2.7-ELEMENTE IN SORTIERTEN ZELLPOPULATIONEN	44
3.3	UNTERSUCHUNG UND VERGLEICH VON ZELLEN IN VERSCHIEDENEN ENTWICKLUNGSSTADIEN DES TCRA/D-REKOMBINATIONSPROZESSES	47
3.3.1	<i>Rearrangements der δRec2.1-2.7-Elemente in Thymozyten</i>	47
3.3.2	<i>Vergleich von PBL, NK-Zellen, Neutrophilen Granulozyten, T- und B-Lymphozyten sowie Thymozyten</i>	49
3.4	SEQUENZEN	52
3.4.1	<i>Analyse der RSS</i>	52
3.4.2	<i>Analyse der sequenzierten Rearrangements bzw. Verbindungsregionen/Verwendung des Dδ- Elementes</i>	55
3.4.3	<i>Homologievergleich der humanen δRec2-Sequenzen mit ihren Pendants bei Mäusen</i>	59
3.4.4	<i>T-Zelllinie DND41</i>	61
4	DISKUSSION	62
4.1	ZUSAMMENHANG ZWISCHEN UMLAGERUNGSFREQUENZ UND ZELLTYP BZW. –ENTWICKLUNGSSTADIUM	62
4.2	BEDEUTUNG DER LAGE VON UMLAGERUNGSELEMENTEN BZW. DEREN FUNKTION BEI DER DELETION VON <i>TCRD</i>	64
4.3	SEQUENZHOMOLOGIE UND –BEDEUTUNG DER RSS BEI DER ERKENNUNG DURCH DEN RAG1/RAG2- KOMPLEX.....	67
4.4	AUSBLICK	68
5	ZUSAMMENFASSUNG	70
	LITERATURVERZEICHNIS	72
	DANKSAGUNG	78
	ERKLÄRUNG	79
	LEBENS LAUF	80
	PUBLIKATIONS LISTE	81

Abkürzungsverzeichnis

- Ak Antikörper
- ALL Akute Lymphatische Leukämie
- ALL My⁺ Akute Lymphatische Leukämie mit myeloischen Markern
- AML Akute Myeloische Leukämie
- AML Ly⁺ Akute Myeloische Leukämie mit lymphatischen Markern
- bp Basenpaare
- C(t) Schwellenzyklus (engl. *copy threshold*)
- CD Differenzierungscluster (engl. *cluster of differentiation*)
- D Diverse(s) Rezeptor-Gensegment(e) (engl. *diversity gene segment*)
- DNA Desoxyribonukleinsäure
- EDTA Ethylene diamine tetraacetic acid
- FACS Fluorescens activated cell sorting
- FAM 6-Carboxy-Fluoreszein
- FITC Fluoreszeinisothiozyanat
- J Verbindende(s) Rezeptor-Gensegment(e) (engl. *joining gene segment*)
- kb Kilobasen
- MHC Haupthistokompatibilitätskomplex (engl. *major histocompatibility complex*)
- moAb Monoklonaler Antikörper (engl. *monoclonal antibody*)
- MRD Minimale Resterkrankung (engl. *minimal residual disease*)
- N-Nukleotid Nichtkeimbahn-Nukleotid (engl. *nongermline nucleotid*)
- PB Peripheres Blut (engl. *peripheral blood*)
- PBL Leukozyten aus peripherem Blut (engl. *peripheral blood leukocytes*)
- PCR Polymerase-Kettenreaktion (engl. *polymerase chain reaction*)
- PJA-BP ψ J α -bindendes Protein

- P-Nukleotid Palindromisches Nukleotid (engl. *palindromic nucleotid*)
- RAG Rekombination aktivierendes Gen (engl. *recombination activating gene*)
- RNA Ribonukleinsäure
- rpm Umdrehungen pro Minute (engl. *rotations per minute*)
- RSS Rekombinations-Signalsequenz (engl. *recombination signal sequence*)
- TAE Tris-Acetic Acid-EDTA
- TAMRA 6-Carboxy-tetramethylrhodamin
- TCR T-Zell-Rezeptor (engl. *T-cell receptor*)
- *TCRA* T-Zell-Rezeptor Alpha
- *TCRB* T-Zell-Rezeptor Beta
- *TCRD* T-Zell-Rezeptor Delta
- *TCRG* T-Zell-Rezeptor Gamma
- TdT Terminale desoxynucleotidyltransferase
- TE Tris-EDTA
- TEA T-Early-Alpha
- TREC T-Zell-Rezeptor Exzisionsring (engl. *T-cell receptor excision circle*)
- V Variable(s) Rezeptor-Gensegment(e) (engl. *variable gene segment*)

1 Einleitung

1.1 Das Immunsystem

Die körpereigene Abwehr ist durch eine Vielzahl von Mechanismen und Regulationseinheiten charakterisiert. Sie lässt sich grob in zwei Gruppen einteilen. Das so genannte unspezifische Immunsystem, bestehend aus Granulozyten, Makrophagen, NK-Zellen und Komplementsystem sowie das evolutionär jüngere, spezifische Immunsystem. Es besteht aus zellulären Komponenten, wie T-Zellen und B-Zellen sowie einer humoralen Komponente, den Antikörpern. Die T-Zellen lassen sich anhand ihrer Oberflächenproteine noch in zwei funktionell verschiedene Subtypen unterteilen, die T-Helferzellen und T-Killerzellen. T-Helferzellen dienen dabei der schnellen Aktivierung und Kommunikation mit B-Lymphozyten. So wird gewährleistet, dass eine möglichst schnelle und spezifische Immunantwort in Form von Antikörpern eingeleitet wird. Diese ist jedoch nur bei extrazellulären Antigenen wirksam. Für intrazelluläre Immunreaktionen sind T-Killerzellen zuständig, die nach Präsentation von Fremdpeptiden auf Molekülen des Haupthistokompatibilitätskomplexes I (MHC I) beliebiger Zellen zelllysierende Substanzen in Form von Granzymen oder Perforinen ausschütten.

Das adaptive Immunsystem, welches bei allen Wirbeltieren zu finden ist, erhält seine Schutzfunktion überwiegend durch die Erkennung von Fremdpeptiden durch Antigen bindende Proteine. Diese werden in zwei Untergruppen unterteilt: Die T-Zell Rezeptoren (TCR), die auf der Oberfläche von T-Lymphozyten exprimiert werden und die Immunglobuline (Ig), die sowohl auf der Oberfläche von B-Lymphozyten exprimiert als auch von Plasmazellen als Antikörper sezerniert werden. Die Gesamtstrukturen von TCR und Ig sind überwiegend konserviert. In einer Eigenschaft unterscheiden sich diese Proteine jedoch von allen anderen. Zusätzlich zu den konservierten Domänen enthalten diese Moleküle Schleifen in der Nähe ihrer N-Termini, die zu antigenbindenden Taschen geformt sind. Die Primärsequenz dieser Peptid-Schleifen gewährleistet, dass jede Tasche spezifische Bindungsaffinitäten zu verschiedenen Antigenen hat. Um möglichst viele Antigene zu erkennen, bildet das Immunsystem eine Vielzahl von Rezeptor-Molekülen, die in der Sequenz ihrer Antigen bindenden Regionen differieren.

Dieses immunologische Repertoire wird, anders als bei allen anderen Genprodukten, durch einen Prozess aus Diversifikation und Selektion generiert. Das Variationspotential wird auf circa 10^{14} theoretisch mögliche Kombinationen bei Immunglobulinen und 10^{18} bei T-Zell-Rezeptoren geschätzt (Janeway et al. 1997). Diese Mannigfaltigkeit kann nicht durch normale

Transkriptions- und Translationsprozesse erzeugt werden. Hierfür ist der seitenspezifische Prozess der Spaltung und Wiederverknüpfung von DNA, genannt V(D)J-Rekombination, verantwortlich (Tonegawa 1983).

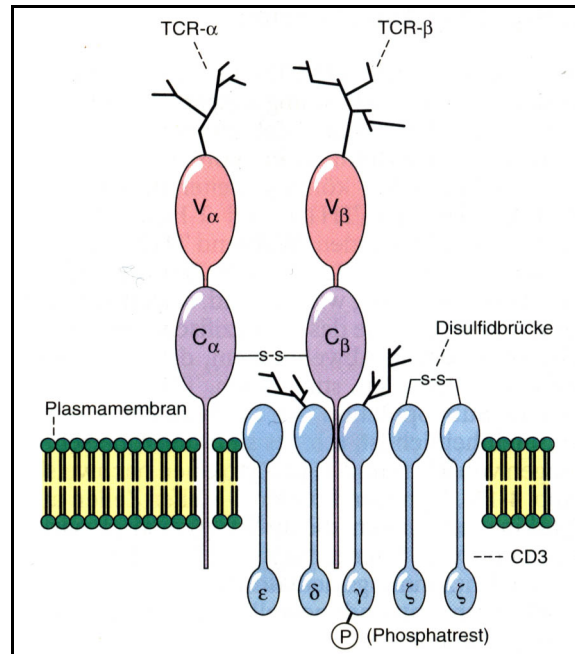


Abb. 1: Der CD3-/T-Zell-Rezeptor-Komplex. Der häufigste besteht aus den Domänen α und β , die ein Heterodimer bilden sowie den CD3 assoziierten Molekülen γ , δ , ϵ und ζ . Letztere sind unter anderem für die Signaltransduktion verantwortlich. Über die variablen Regionen α und β des T-Zell-Rezeptors wird das Antigen in Zusammenhang mit HLA-Klasse I oder HLA-Klasse II (CD8- bzw. CD4- positive T-Lymphozyten) gebunden. (Böcker et al. 1996)

1.2 T-Zell-Reifung und -Entwicklung

T-Lymphozyten entstehen aus hämatopoetischen Vorläuferzellen im Knochenmark und reifen im Gegensatz zu B-Lymphozyten nicht in diesem heran, sondern differenzieren weiter im Thymus. Diese Reifung dient hauptsächlich dem Zweck, ein möglichst großes Reservoir an Fremdepitope erkennenden T-Zellen bzw. T-Zell-Rezeptoren zu generieren. Dabei muss gewährleistet werden, dass diese Zellen nicht bzw. nur gering autoreaktiv sind.

Die verschiedenen Entwicklungsstadien lassen sich anhand bestimmter Oberflächenmarker (CD = *cluster of differentiation*) immunophänotypisieren. Die wichtigsten Marker sind CD3, ein Bestandteil des T-Zell-Rezeptorkomplexes, CD4, als Marker für T-Helferzellen und CD8, ein Oberflächenprotein auf T-Killerzellen (Guidos 1996, Ismaili et al. 1996). Diese Proteine agieren als Corezeptoren zur Signaltransduktion bzw. Aktivierung der T-Zellen (Cantrell 1996).

Im Knochenmark generiert, sind zunächst alle T-Lymphozyten CD4/CD8 negativ, um im weiteren Verlauf der Differenzierung im Thymus doppelt positiv für diese Marker zu werden (Sotzik et al. 1993). In diesem Entwicklungsstadium ist die T-Zelle nicht funktionell, da weder TCR noch CD3-Moleküle exprimiert werden. Dem schließt sich das DNA-Rearrangement der T-Zell-Rezeptorkettengene an (siehe Kapitel 1.3). Zusammen mit CD3 wird darauf ein funktioneller TCR auf der Oberfläche der Zelle exprimiert. Die Zelle ist nun CD4+, CD8+, TCR+ und CD3+. T-Lymphozyten mit nicht funktionell rearrangierten TCR-Genen gehen in Apoptose. Es folgt die Phase der positiven Selektion, in der Zellen, die mit MHC-Selbstpeptid-Molekülen schwach reagieren, überleben. T-Zellen, die hingegen mit ihrem T-Zell-Rezeptor keine oder zu starke Bindungsaffinität zum MHC-Selbstpeptid-Komplex haben, gehen entweder in Apoptose (Negative Selektion) oder lagern durch den Prozess des Rezeptor-Editing ihren T-Zell-Rezeptor erneut um und werden ein weiteres Mal positiv bzw. negativ selektiert (Mc Gargill et al. 2000, Abb. 2). Anschließend beenden sie, je nach MHC-Affinität des TCR, die Expression eines der beiden Corezeptoren und werden so zu einfach positiven CD4-T-Lymphozyten, die Antigene, präsentiert auf MHCII-Molekülen, erkennen oder zu Antigen-MHCI bindenden, CD8-positiven T-Lymphozyten (Boumsel et al. 1990).

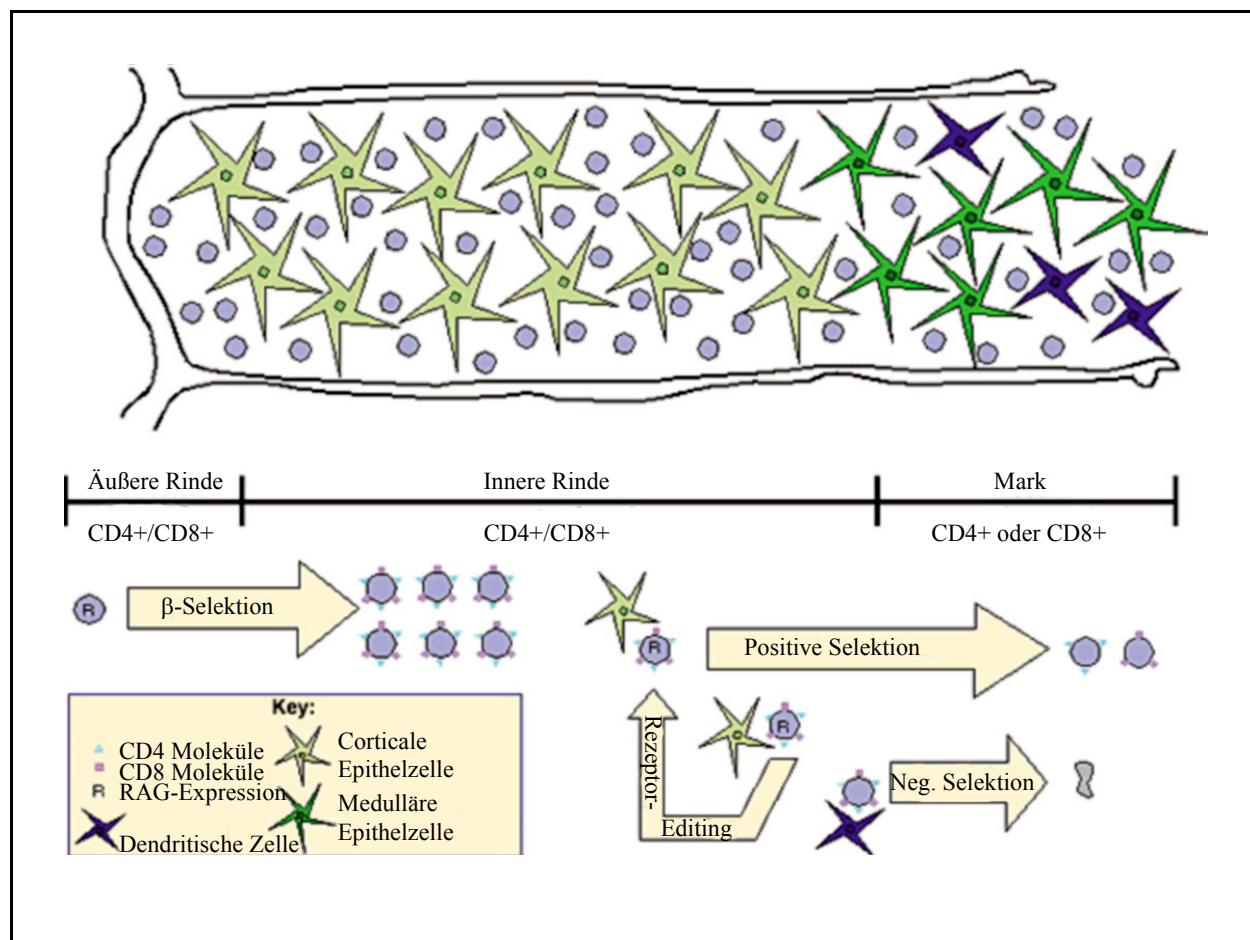


Abb. 2: Entwicklung von α/β -T-Zellen im Thymus: Dargestellt ist das Modell eines Thymuslappens, inklusive Mark sowie äußerer und innerer Rinde. Die Thymozyten bewegen sich dabei zentripetal (hier von links nach rechts) während ihres Reifungsprozesses, welcher in den verschiedenen Phasen durch die Expression verschiedener Marker, wie RAG (R), CD4- (Dreiecke) und CD8- (Quadrate) Corezeptor-Molekülen gekennzeichnet ist. Während der T-Zell-Differenzierung werden die Antigen-Rezeptorgene sequenziell rearrangiert und einmalig exprimiert, um die Interaktion von Thymozyten mit unterschiedlichen Zelltypen zu ermöglichen. Diese „Partner“ schließen corticale und medulläre Epithelzellen, genauso wie Antigen präsentierende Zellen aus dem Knochenmark (z.B. Dendritische Zellen), ein. Die Prozesse der β -Selektion, Positiver und Negativer Selektion und des Rezeptor-Editings machen aus einem initial zufällig generiertem TCR-Repertoire eines, welches individuell zugeschnitten und effektiv ist, um Pathogene zu eliminieren (Abb. aus Fink 2000).

1.3 TCR-Rearrangement/V(D)J-Rekombination

Es wird angenommen, dass die Ursprünge der V(D)J-Rekombination ca. 450 Millionen Jahre alt sind. Die Fähigkeit dazu stellte einen großen Vorteil im Wettrennen zwischen Wirbeltieren und ihren Pathogenen dar, da das hohe Potential an Diversität den Wirt mit einer Waffe ausstattete, die Angriffe der ständig mutierenden Mikroben zu kontern (Lewis et al. 1997, 2000). Der Prozess der V(D)J-Rekombination wurde erstmals 1976 von S. Tonegawa für Immunglobulingene beschrieben. Er ist aber, bis auf einige Ausnahmen, ebenso auf das

Rearrangement der T-Zell-Rezeptorgene anzuwenden (Alt et al. 1986). Jeder TCR besteht aus zwei Molekülketten, die ein Heterodimer bilden, entweder α/β , wie auf 95 % aller T-Lymphozyten oder γ/δ , welche auf einer bestimmten Subpopulation von T-Zellen, die hauptsächlich Abwehrfunktionen in der Haut und im Darmepithel übernehmen, exprimiert werden (Havran et al. 1988, Moretta et al. 1991). Im Gegensatz zu konventionellen α/β -T-Zellen, welche nur MHC präsentierte Proteine erkennen, können γ/δ -T-Lymphozyten direkt auf Proteine und nichtproteinartige Phospholiganden reagieren (Kaufmann 1996).

Der für den *TCRD* codierende Genabschnitt auf Chromosom 14, Bande 14q11, ist in zahlreichen Arbeiten beschrieben worden und liegt inmitten des T-Zell-Rezeptor α -Gens (Loh et al. 1987/1988, Isobe et al. 1988, Takihara et al. 1988/1989, Satyanarayana et al. 1988). Um die hohe Variabilität der Rezeptorketten zu ermöglichen, werden bestimmte Gensegmente umgelagert. Diese unterscheiden sich in ihrer Funktion für den künftigen Rezeptor und werden als *variable* (V), *diversity* (D) und *joining* (J) Elemente bezeichnet und mit nicht rearrangierten *constant regions* (C) verknüpft. Der variable Abschnitt wird bei β - und δ -Ketten aus V-, D- und J-Segmenten, bei γ - und α -Ketten nur aus V- und J-Segmenten, gebildet. Die eigentliche Rekombination wird durch Aktivierung eines Enzymkomplexes (V(D)J-Rekombinase) der Gene RAG1 und RAG2 (*recombination activating gene*) eingeleitet. Dieser erkennt bestimmte Sequenzen 5' und 3' der Gensegmente (Oettinger et al. 1990, Schatz et al. 1992, Sadofski et al. 2001, van Gent et al. 1996). Das führt wiederum zum Doppelstrangbruch der DNA und zur Verknüpfung der nun freien Enden. Der deletierte DNA-Abschnitt wird ringförmig zu einem *T-cell receptor excision circle* (TREC), auch *signal joint* genannt, verbunden (Steinmetz et al. 1980). Die Variabilität des codierenden Abschnittes wird nochmals durch Haarschleifen-Bildung von *sticky ends* (P-Nukleotide; Sakano et al. 1981) sowie Nukleotidinsertion und -deletion (N-Nukleotide) durch die Terminale desoxynukleotidyl-Transferase (TdT) an den Verknüpfungsstellen gesteigert (Gilfillan et al. 1993, Komori et al. 1993).

Die Erkennungssequenzen (RSS) des RAG1/RAG2-Komplexes bestehen aus für die erfolgreiche Rekombination unterschiedlich wichtigen Einheiten: einem Heptamer, einem Spacer sowie einem Nonamer (Max et al. 1979, Sakano et al. 1979). Die Consensussequenz ist in Abbildung 4 gezeigt. Das in palindromischer Sequenz vorliegende Heptamer ist dabei von größter Bedeutung. Schon der Austausch von ein oder zwei Basen führt zur wesentlich selteneren Erkennung durch die V(D)J-Rekombinase. Besonders die ersten drei Basenpaare des Heptamers (CAC) sind

essentiell, während für das Nonamer Poly-A-Nukleotide, insbesondere an 5. und 6. Stelle, charakteristisch sind (Hesse et al. 1989, Akamatsu et al. 1994, Bockheim Steen et al. 1997). Es lassen sich zwei Formen von *recombination signal sequences* unterscheiden. 12-RSS, mit einem 12 Basenpaare langen Spacer, 3' von V- und D-Elementen lokalisiert sowie 23-RSS, mit einem 23 bp langen Spacer, die sich 5' von D- und J-Elementen befinden. Diese relativ fest definierte Länge der Spacer korrespondiert mit einer bzw. zwei Drehungen der DNA-Doppelhelix, was eine präzise, räumliche Orientierung zwischen den konservierten Nukleotidblöcken gewährleistet. Dabei gilt die Regel, dass nur 12-RSS und 23-RSS gleichzeitig von der V(D)J-Rekombinase erkannt und geschnitten werden können (12/23-Regel) (Early et al. 1980, Sakano et al. 1980, Eastman et al. 1996). Diese Regel beschränkt die Rekombinationsmöglichkeiten auf produktive Gensegment-Kombinationen. Die Lage der RSS verhindert damit eine unkontrollierte Verknüpfung von nur V- bzw. nur J-Elementen, da jedes V-Segment, respektive J-Segment, denselben Typ von Signalsequenz besitzt (Lewis et al. 1994).

Die Abfolge der Rekombinationen beginnt, im Falle von *TCRD*, immer mit einem Rearrangement von D-Elementen gefolgt von D-J- und V-D-Umlagerungen (Lindsten et al. 1987, Hara et al. 1991, van der Stoep et al. 1990, Hansen Hagge et al. 1992). Hierbei ist interessant, dass es trotz 12/23er-Kompatibilität von V- und J-Segmenten nur sehr selten zu direkten V-J-Umlagerungen kommt, was zeigt, dass ein weiterer Faktor die ungehinderte Rekombination begrenzen muss (Bassing et al. 2000, Livak et al. 2000).

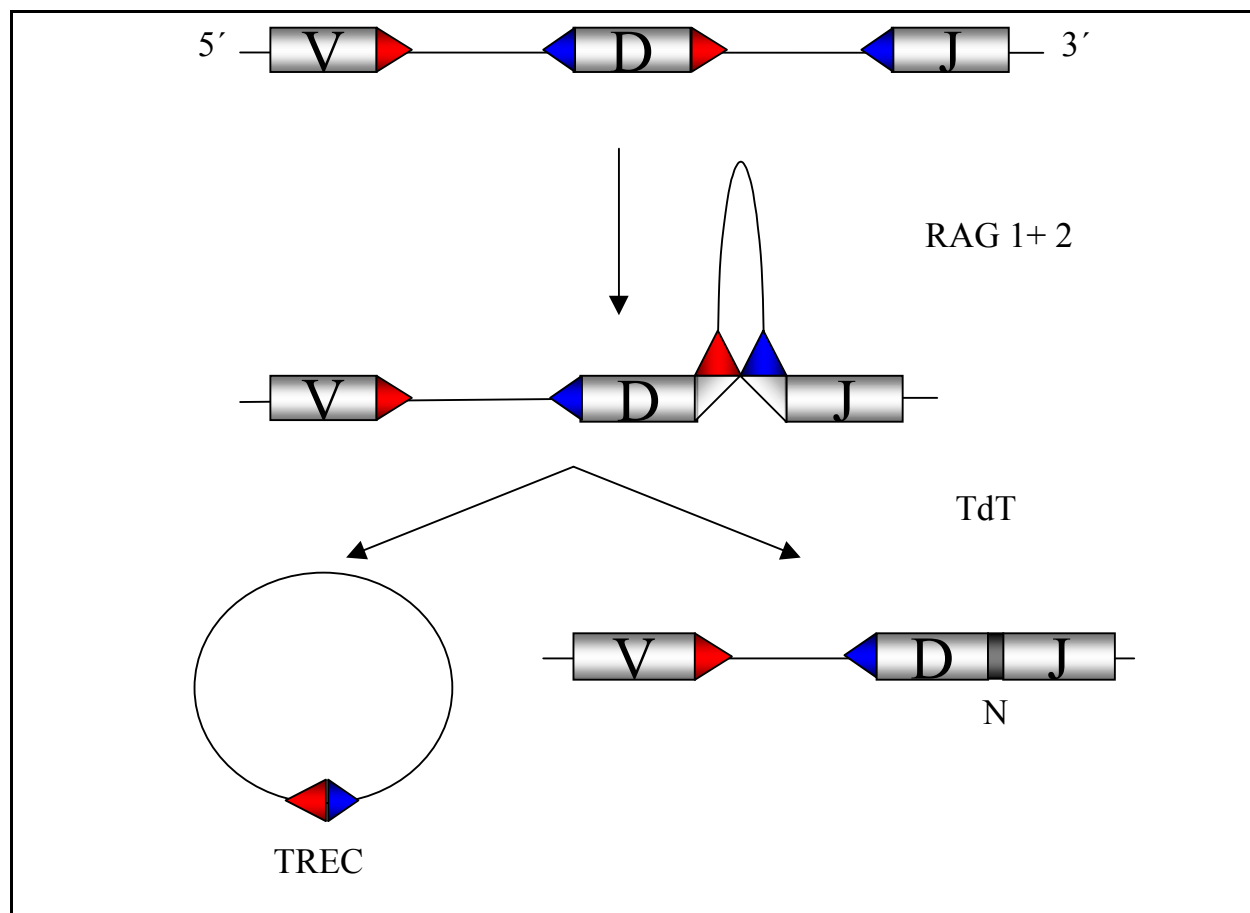


Abb. 3: Ablauf der V(D)J-Rekombination: Die grauen Rechtecke stehen für codierende DNA-Segmente. Jedes dieser Segmente ist assoziiert mit einer (V,J) oder zwei RSS (D), welche wichtig für die Doppelstrangspaltung sind. Die blauen Dreiecke stehen für 12-RSS, rote für 23-RSS. Nach Spaltung der DNA durch den RAG1/RAG2-Komplex entstehen *blunt ends* an den RSS sowie Haarschleifen an den codierenden Segmenten. Die *blunt ends* werden zum so genannten *signal joint* oder auch TREC zusammengefügt. An den codierenden Segmenten werden vor Verbindung zum *coding joint* noch N-Nukleotide durch die Terminale desoxynucleotidyl Transferase (TdT) eingefügt bzw. entfernt.

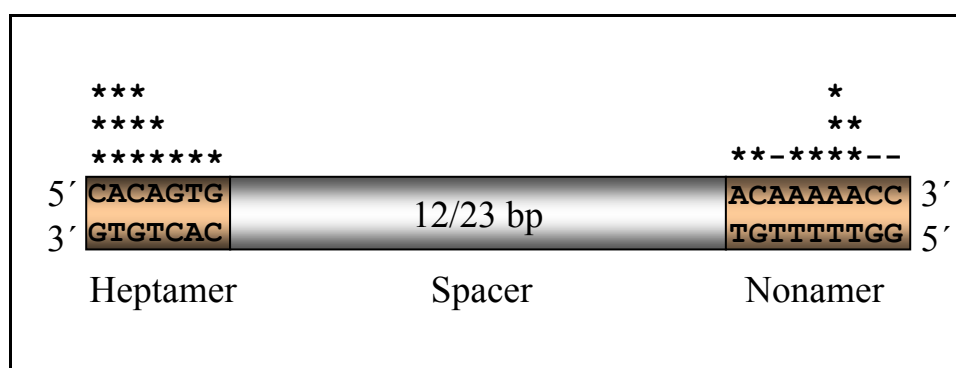


Abb. 4: schematischer Aufbau einer recombination signal sequence: RSS bestehen aus palindromischem Heptamer, adeninreichem Nonamer und 12 bzw. 23 +/-1-2 bp langem Spacer. Die relative Bedeutung der Positionen, funktionell definiert mittels Plasmid-Assay, ist mit Sternen verdeutlicht (Hesse et al. 1989)

1.4 *TCRD*-Deletion als Zwischenschritt der Entwicklung zur reifen α/β -T-Zelle

Im Verlauf der T-Lymphopoese werden die unterschiedlichen TCR-Ketten zu verschiedenen Zeitpunkten umgelagert. Das allgemeine Modell des Rekombinationsprozesses postuliert die sterile, nichtrearrangierte Expression der *TCRB*-Kette, die, assoziiert mit prä-T α , den prä-TCR-Komplex bildet. Dieser Prozess ist für den auch β -Selektion genannten Vorgang im Thymus nötig (Aifantis et al. 1998). Vorher muss ein produktives Rearrangement der Gensegmente für die δ - und γ -Rezeptor-Kette erfolglos gewesen sein. Der prä-TCR wird auf frühen T-Zellen exprimiert, welches eine schnelle Proliferation und Differenzierung der Zellen, die Unterbindung von weiteren β -Kettengen- Umlagerungen, den *TCRB*-Allel-Ausschluß sowie die Expression der Corezeptor-Proteine CD4 und CD8 induziert (Livak et al. 1995/1999, Blom et al. 1999, von Boehmer et al. 1999, Kruisbeek et al. 2000). Das *TCRA*-Gen jedes daraus entstehenden T-Lymphozyten kann durch weitere V-J-Rearrangements variiert werden (Petrie et al. 1993). Kommt es hingegen zur erfolgreichen Rekombination der *TCRD*- und -*TCRG*-Gene, findet keine weitere Umlagerung von β - oder α -Rezeptorgenen statt und die Zelle wird zum γ/δ -T-Lymphozyten.

Es wurde gezeigt, dass für ein erfolgreiches Rearrangement des α -Rezeptorgens auf Chromosom 14q11 eine Deletion des innerhalb der α -Kettengene liegenden δ -Rezeptors notwendig ist (Griesser et al. 1988, Satyanarayana et al. 1988). Daran ist ganz maßgeblich das Rearrangement von δ Rec, einer 5' vom *TCRD*-Gen gelegenen RSS, mit dem 3' vom *TCRD* gelegenen ψ J α -Element beteiligt (de Villartay et al. 1987,1991, Hockett et al. 1988). Neben diesem sind noch weitere, mehr oder weniger wichtige, Rekombinationen mit J α 58, J δ 1 und D δ 3 beschrieben, die sehr häufig in Thymozyten und eher selten in Lymphozyten aus peripherem Blut gefunden werden. Für die *TCRD*-Deletion relevante Umlagerungen sind δ Rec- ψ J α , gefolgt von δ Rec-J α 58 und V α -(D δ)-J α (Verschuren et al. 1997/1998). Bei V α -(D δ)-J α -Umlagerungen ist jedoch nicht genau zu klären, ob diesen ein Rearrangement der beiden erstgenannten *TCRD*-Deletionsmöglichkeiten vorausging. Diese *TCRD*-Umlagerungen sind nicht als T-Zell-spezifisch anzusehen (Dyer et al. 1989).

1.5 Bedeutung des Nachweises von klonspezifischen Umlagerungen zur Diagnostik bei MRD

Molekulare Analysen von Antigen-Rezeptor-Genen sind seit einiger Zeit für die Detektion von minimalen Resterkrankungen (MRD) etabliert. Sowohl für die akute lymphatische Leukämie (ALL) der B-Zell- (B-ALL) als auch T-Zell-Reihe (T-ALL) werden Rearrangements der CDRIII-Region der schweren (IgH) und leichten Kette (IgL) der Immunglobulingene bzw. β -, δ - und γ -T-Zell-Rezeptorgene analysiert (Hansen-Hagge et al. 1989, Li et al. 1999). Da auch bei B-Lymphozyten inkomplette Umlagerungen der TCR-Gene stattfinden, werden bei B-ALL auch diese, meist V δ 2-D δ 3 oder D δ 2-D δ 3, analysiert (Loiseau et al. 1989, Biondi et al. 1990). Genauso sind für T-ALL neben den normalen V1-J1- oder D2-J1-Umlagerungen auch Immunglobulinrearrangements der schweren Kette (IgH) beschrieben (Pelicci et al. 1985, Waldmann et al. 1985, Asou et al. 1989).

Ursprünglich wurden diese Umlagerungen mittels Southern-Blot-Technik detektiert. Gegenwärtig wird jedoch die sehr viel sensitivere Methode der semiquantitativen oder quantitativen PCR angewandt, wobei die erstgenannte Methodik durch die Verwendung von nested-Primern und der damit verbundenen höheren Sensitivität und Spezifität der letztgenannten überlegen ist (Seriou et al. 1995, Brisco et al. 1991, Pongers-Willemse et al. 1998, Nyvold et al. 2000, Valetto et al. 2000). Das Ansteigen und Abfallen an Kopienzahlen des malignen Klons, respektive seines charakteristischen Rearrangements, dient hierbei als prognostischer Marker für den weiteren Krankheitsverlauf des Patienten nach Chemotherapie oder Knochenmarktransplantation. So kann ein Rezidiv frühzeitig erkannt werden und eine unnötige Therapiebelastung des Patienten bei negativem PCR-Ergebnis vermieden werden. Die MRD-Verlaufsmessung bildet dabei die Basis für die Therapiestratifikation bei Standard-Risiko-Patienten mit ALL nach einem Jahr Behandlung (van Dongen et al. 1998).

Charakteristische Rekombinationspartner dieser klonotypischen Umlagerungen sind je nach Ursprungszelle und Reifungsstadium häufig beschrieben worden. So ist bei Rearrangements der Akuten Lymphoblastischen Leukämie der T-Zell-Reihe (T-ALL) meist das Rekombinationselement V δ 1 involviert (Biondi et al. 1989), während bei ALL der B-Zell-Reihe (B-ALL) V δ 2-Umlagerungen die Regel sind (Biondi et al. 1990).

Außer bei pre-B-ALL werden illegitime Rearrangements auch bei Akuten Myeloischen

Leukämien mit Coexpression von T-lymphozytären Antigenen (AML Ly⁺) gefunden (Fontenay et al. 1990, Yumura- Yagi et al. 1991, Adriaansen et al. 1991, Schmidt et al. 1994, 1995). Als My⁺ Akute Lymphatische Leukämie bezeichnet man Leukämien mit Blasten, die sowohl lymphatische als auch myeloische Antigene exprimieren, jedoch nicht der biphänotypischen Leukämie zuzurechnen sind, da die lymphatische Antigenexpression überwiegt.

In vorhergehenden Studien von Schmidt et al. 1992, 1996 und Przybylski et al. 1994 wurden 16 *TCRD*-Umlagerungen in zehn von 66 AML Ly⁺ gefunden. Diese Umlagerungen sind klonospezifisch, durch zufällig generierte Verbindungsregionen aus P- und N-Nukleotiden (Hansen Hagge et al. 1989, Macintyre et al. 1990, Breit et al. 1993) und lassen eine unmittelbare Kontrolle des Proliferationsverhaltens des malignen Klons zu. Δ - und γ -Rezeptorgene werden bevorzugt analysiert, da diese früh rearrangieren und es sich bei den ALL meist um frühe Stadien der Zellreifung handelt. Ein weiterer Grund sind die, begründet durch die geringe Anzahl an Rekombinationselementen, begrenzten Rearrangement-Varianten. Das *TCRD*-Gen besitzt lediglich acht V-, drei D- und vier J-Untereinheiten und generiert weitere Variationen der Gensequenz alleinig durch Nukleotiddeletion bzw. -insertion mittels der Terminalen desoxynucleotidyl-Transferase an den Enden der neu verbundenen Genabschnitte (Loh et al. 1988, Hata et al. 1988).

Solche Untersuchungen sind jedoch nur in 80% der precursor-B-ALL- und 70% der T-ALL-J δ 1-Rearrangements erfolgreich (van Dongen et al. 1991). 20-30% der Umlagerungen können weder per Restriktionsfragmentlängen-Analysen noch PCR identifiziert werden. Mittels Southern-Blot-Technik lassen sich diese zwar detektieren, jedoch keinem bekannten Muster zuordnen (Schmidt et al. 1992, Breit et al. 1993, Przybylski et al. 1994). Es wird angenommen, dass in solchen Fällen meist atypische, nicht an codierende Sequenzen gekoppelte, RSS-Elemente als Rekombinationspartner für codierende Elemente erkannt werden (Lewis et al. 1985, Akira et al. 1987, Hesse et al. 1987) oder Rearrangements mit *TCRA*-Genelementen stattfinden (Isobe et al. 1988, Verschuren et al. 1997). Solche, frei von codierenden Gensegmenten stattfindenden, auch interchromosomale Rekombinationsprozesse sind zum Teil auch Ursache für maligne Erkrankungen auslösende Translokationen (Tycko and Sklar 1990, Rabbits 1994, Agrawal 1998).

Aufgabenstellung

Rekombinationen der TCR- und Ig-Gene besitzen neben ihrer physiologischen Funktion Bedeutung zum Nachweis minimaler residueller Erkrankungen (MRD). Neben normalen V(D)J-Rekombinationen, kommt es immer wieder auch zur Verknüpfung von codierenden und nicht codierenden Elementen sowie zu Translokationen. Dies geschieht über so genannte isolierte *recombination signal sequences*, Basenpaarungen, die von der V(D)J-Rekombinase erkannt werden, was schon in verschiedenen Arbeiten gezeigt wurde (Hochtl et al. 1983, Moore et al. 1985, Reth et al. 1986, Komori et al. 1989, Shimizu et al. 1991, Migone et al. 1995). Meist werden Umlagerungen mit diesen Elementen jedoch nicht exprimiert, sondern durch darauffolgende Rearrangements wieder eliminiert. Das Allel mit einer funktionellen Umlagerung wird meist bevorzugt bzw. ein so genanntes *out of frame*-Transkript nicht übersetzt. Jedoch können diese Umlagerungen durchaus auch für die Diagnostik der minimalen Resterkrankung bei ALL genutzt werden. Das bei einer AML mit lymphatischen Markern gefundene, neue *TCRD*-Rekombinationselement $\delta\text{Rec}2$ (Przybylski et al. 2001) galt es näher zu untersuchen. Erste Versuche des Nachweises der Umlagerung an gesunden Individuen zeigten, dass sich 3' von $\delta\text{Rec}2$ noch weitere Elemente befanden. Folgende Fragen sollten bearbeitet werden:

1. Stellen diese atypischen Rearrangements einen gestörten Differenzierungsschritt dar oder sind sie auch in peripheren Leukozyten Gesunder, als Zwischenschritt der normalen Lymphopoese, zu finden?
2. Sind diese Rearrangements T-Zell-spezifisch oder sind sie auch in anderen Zellen des Immunsystems, wie B-Lymphozyten oder NK-Zellen, zu finden?
3. Sind diese Umlagerungen ein End- oder Zwischenschritt des *TCRA/D*-Rekombinationsprozesses ?

Untersucht wurden die Rekombinationselemente D δ 3 und J δ 1, da diese sehr häufig an Rearrangements des *TCRD*-Genes beteiligt sind. Als zusätzliches Element wurde das 3' vom *TCRD*, im *TCRA*-Gen, gelegene $\psi\text{J}\alpha$ in die Untersuchungen aufgenommen. Es ist bekannt, dass Umlagerungen von δRec mit diesem Element zur Deletion des *TCRD*-Genes führen (de Villartay 1987). Ziel war es, zu einer quantitativen Aussage zu kommen, das heißt zu klären, wie häufig diese Rekombinationen in den untersuchten Zellpopulationen auftreten.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Patientenkriterien und Probengewinnung

Für den ersten Teil der Aufgabenstellung wurden zehn gesunde Spender ausgewählt und jeweils 10 ml Blut aus deren peripheren Armvenen entnommen. Aus diesem wurde dann, nach Dextranaufreinigung mittels der in Kapitel 3.2.3 beschriebenen Phenol-Chloroform-Extraktion, die DNA gewonnen. Diese wurde im weiteren Verlauf via Spektrophotometrie und Gelauftrag auf ihre Konzentration geprüft und daraus Äquivalente in Form von Zellzahlen gebildet. Diese betrugen: 5×10^4 Zellen = 325 ng DNA, 2×10^5 Zellen = 1300 ng DNA und 5×10^5 Zellen = 3250 ng DNA.

Des Weiteren wurden acht gesunde Spender ausgewählt und je 30 ml Blut entnommen. Dieses wurde dann vom FACS (*fluorescence activated cell sorter*) über 8 bis 9 Stunden nach den in Tabelle 6 aufgeführten Oberflächenmarkern sortiert. Aus dem sortierten Material wurde sodann die DNA nach demselben Procedere wie bei den unsortierten Leukozyten gewonnen. Der weitere Verfahrensweg gestaltete sich wie im ersten Teil. Es wurde in Anbetracht der geringen Menge an Zellen nur eine Konzentration von 65 ng DNA entsprechend 1×10^4 Zellen verwendet.

Für den dritten Teil der Arbeit wurden Thymozyten von vier Neugeborenen nach kardiologischem Eingriff, bzw. vier Feten verwendet. Auch hier fand die DNA-Gewinnung nach der angegebenen Extraktionsmethode statt. Als Zellmenge wurde auch hier eine Konzentration von 65 ng DNA bzw. 1×10^4 Zellen verwendet.

Alle humanen Zellproben wurden in Übereinstimmung mit den Richtlinien der Komitees für Medizinische Ethik in Polen, Deutschland und den Niederlanden gewonnen.

Tabelle 1: Thymozytenproben

Nr.	Thymusalter	Nr.	Thymusalter
1	4,5 Monate (fetal)	5	20 Monate (postnatal)
2	9 Monate (postnatal)	6	postnatal
3	4,5 Monate (fetal)	7	fetal
4	9 Monate (postnatal)	8	fetal

2.1.2 Primer- und Sondendesign

Die Sequenzen der Oligonukleotid-Primer wurden von TIB MOLBIOL (Berlin) synthetisiert und sind in Tabelle 1 aufgelistet. Die Primer Jd1(+155) und Jd1(+62) wurden von Yokota et al. 1991 publiziert. Die anderen Primer wurden, basierend auf der Nukleotidsequenz des T-Zell-Rezeptor δ , synthetisiert (Boysen et al. 1997). Die TaqMan-Sonde wurde ebenso von TIB MOLBIOL (Berlin) synthetisiert. Die D δ 3-Sonde wurde am 5'-Ende mit 6-Carboxy-Fluorescein (FAM) und am 3'-Ende mit 6-Carboxytetramethylrhodamin (TAMRA) markiert. Die Sonde wurde auf 100 μ M verdünnt und bis zum Gebrauch bei -20°C gelagert.

Tabelle 2: Verwendete Primer, synthetisiert von TIB MOLBIOL, Berlin

Primer	Abstand	Größe	Sequenz
5' Primer :			
δ Rec2.1	-102	20-mer	5'- ATG AGA ACC CCA AGG CAC AG
δ Rec2.1	-66	20-mer	5'- GCC CAA AGT AGC ATA GCT AG
δ Rec2.2	-59	20-mer	5'- CCC AAA TGA CCT CTC AAG TG
δ Rec2.3	-370	20-mer	5'- AAG CCT GAT TGT CCT GGC TG
δ Rec2.4	-79	20-mer	5'- CTG ACA ACC ACA ATT CTC TG
δ Rec2.5	-483	20-mer	5'- GTT AGG GTC TTA GTC CAC TG
δ Rec2.6	-62	21-mer	5'- AAT TTC GCA ACG CTT CTC TCC
δ Rec2.7	-107	22-mer	5'- GGT AAC AGC GTA CAT TCC AGT G
δ Rec2.8		21-mer	5'- GAC AGG GCA AAG GAA GTC AAG
3' Primer :			
D δ 3	+33	20-mer	5'- GTA GGT TTT GTA GCA CTG TG
D δ 3	+77	20-mer	5'- AGG GAA ATG GCA CTT TTG CC
D δ 3	+180	20-mer	5'- AGT TTC ACC CAA GGA AGA AC
J δ 1a	+155	21-mer	5'- AAA TGC TAG CTA TTT CAC CCA
J δ 1b (bio)	+102	20-mer	5'- GAT GGA GGA TGC CTT AAC CT
J δ 1c	+62	21-mer	5'- GAG TTA CTT ACT TGG TTC CAC
ψ J α	+208	21-mer	5'- CAT GGG AAT AAC TGT AGG CTC
ψ J α	+126	22-mer	5'- GGC ACA TTA GAA TCT CTC ACT T
Sonde:			
D δ 3 FAM-Dabcyl	+26	36-mer	5'- 6FAM-CAG GTC TCT GTA GGT TTT GTA GCA CTG TGC GTA TCC-Dabcyl

Tabelle 3: Reagenzien und Kits

Reagenz	Firma, Ort, Land
Agarose	Serva, Heidelberg, Deutschland
Nusieve (GTG-Agarose)	FMC-Products, New York, USA
10 x PCR Puffer	Perkin Elmer Cetus, Foster City, USA
10 x PCR Puffer	Gibco BRL, Eggenstein, Deutschland
MgCl ₂ (50mM)	Gibco BRL, Eggenstein, Deutschland
Gibco Taq Polymerase Platinum (5 U/μl)	Gibco BRL, Eggenstein, Deutschland
Ampli Taq DNA Polymerase (5 U/μl)	Perkin Elmer Cetus, Foster City, USA
Desoxynukleosidtriphosphate-Set (dNTPs) (10 mM)	Gibco BRL, Eggenstein, Deutschland
DNA-Leiter 123 bp	Gibco BRL, Eggenstein, Deutschland
DNA-Marker λHDIII	Boehringer, Mannheim, Deutschland
Paraffinöl	Merck, Darmstadt, Deutschland
Aqua dest.	Braun, Melsungen, Deutschland
Dextran	Roth, Karlsruhe, Deutschland
NaCl	Merck, Darmstadt, Deutschland
Ammoniumchlorid	Merck, Darmstadt, Deutschland
Kaliumhydrogencarbonat	Merck, Darmstadt, Deutschland
EDTA	Merck, Darmstadt, Deutschland
Tris (Hydroxymethylaminomethan)	Merck, Darmstadt, Deutschland
Proteinase K	Merck, Darmstadt, Deutschland
SDS (Dodecylsulfat-NaCl)	Serva, Heidelberg, Deutschland
Chloroform	Merck, Darmstadt, Deutschland
Isoamylalkohol	Merck, Darmstadt, Deutschland
Na-acetat	Merck, Darmstadt, Deutschland
Ethanol	Serva, Heidelberg, Deutschland
Glycerol	Gibco BRL, Eggenstein, Deutschland
Eisessig (Essigsäure 100%)	Merck, Darmstadt, Deutschland
Ethidiumbromid	Serva, Heidelberg, Deutschland
Succhrose	Serva, Heidelberg, Deutschland
Bromphenolblau	Merck, Darmstadt, Deutschland
Quiaquick Gel Extraktion Kit	Quiagen, Hilden, Deutschland

TA-EASY Cloning Vector	Promega, Madison, USA
Dinatriumsalz-Dihydrat (EDTA-Titriplex)	Merck, Darmstadt, Deutschland
PBS (phosphatgepufferte Kochsalzlsg. (10x))	Gibco BRL, Eggenstein, Deutschland
monoklonale Antikörper (moAb)	
CD3-PE	Becton Dickinson, Franklin Lakes, USA
CD 66b-FITC	Beckman Coulter, Fullerton, USA
CD 19-FITC	Beckman Coulter, Fullerton, USA
CD16-PE	Beckman Coulter, Fullerton, USA
CD 56-PE	Becton Dickinson, Franklin Lakes, USA

Tabelle 4: Reagenzienmischungen

Reagenzienmischung	Rezept
Dextranlösung (steril, 4°C, 5%)	20 g Dextran 3,504 g NaCl 400 ml A. dest
10 x Lyse-Puffer	8,02 g, 1,5 M Ammoniumchlorid 1,0 g, 0,1 M Kaliumhydrogencarbonat 0,037 g EDTA mit 2H ₂ O = Titriplex III 100 ml A. dest.
STE	1 ml, 1 M Tris (pH 8,0) 2 ml, 5 M NaCl 0,2 ml, 0,5 M EDTA (pH 8,0) 96,8 ml A. dest.
Proteinase K (20 mg/ml, 20°C)	100 mg gelöst in 5 ml A. dest.
Na-Acetat (3 M, 20°C)	204,12 g ad 500 ml A. dest.
TE-Puffer (pH 8,0/20°C)	2 ml, 0,5 M EDTA (pH 8,0) 10 ml, 1 M Tris (pH 8,0) 1000 ml A.dest.

TAE-Puffer (1 x):	2,42 g Tris 0,57 ml Eisessig 1 ml EDTA (pH=0,8/0,5M) 500 ml A. dest.
Gelladepuffer	Succhrose (40%) Bromphenolblau (0,05-0,25 %) 10 ml A. dest.

Tabelle 5: Verwendete Geräte

Gerät	Hersteller
TRIO-Thermoblock	Biometra, Göttingen, Deutschland
WIDE MINI SUB CELL (Gelelektrophoresekammer)	Biorad, Hercules, USA
Gene Quant II (Spektrophotometer)	Pharmacia, Uppsala, Schweden
ABI PRISM 7700 Sequence Detector	Perkin Elmer, Foster City, USA
Zentrifuge 5403	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Megafuge 1.0	Heraeus Instruments, Hanau, Deutschland
Reax 2000	Heidolph, Schwabach, Deutschland
GFC 3025 (Reagenzglasrotator)	GFL, Burgwald, Deutschland
Bio Doc CCD-Camera	Biometra, Göttingen, Deutschland
Video Graphik Printer UP-890 CE	Sony, Tokyo, Japan
Polyethylen-Reaktionsgefäße (0,5 ml; 1 ml; 1,5 ml; 2 ml)	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Polyethylenröhrchen (10 ml)	Falcon, New Jersey, USA
MicroAmp Optical Tubes	Perkin Elmer, Foster City, USA
MicroAmp Optical Caps	Perkin Elmer, Foster City, USA
FACS Vantage Sorter	Becton Dickinson, Franklin Lakes, USA
Enterprise 621 Single Laser	Becton Dickinson, Franklin Lakes, USA
ALF Sequencer	Pharmacia, Uppsala, Schweden

2.1.3 Soft- und Hardware

Diese Arbeit wurde auf einem Pentium II-Computer (Intel) realisiert. Als Textverarbeitung, Tabellenkalkulation und Grafikprogramm kam Microsoft Office 97 zum Einsatz. Die Grafiken wurden mit Corel Draw 8 bzw. Adobe Photoshop 5.0 erstellt und bearbeitet. Als Werkzeuge zum Analysieren von DNA-Sequenzen wurden die Programme DNA-Star und Chromas benutzt. Auf folgende Internetressource wurde zurückgegriffen:

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>.....National Center for Biotechnology Information

2.2 Methoden

2.2.1 Aufreinigung der Leukozytensubpopulationen durch Fluorescence activated cell sorting (FACS)

Dreißig Milliliter EDTA-antikoagulierte Blutproben wurden mit folgenden gepaarten Monoklonalen Antikörpern (moAb) abgesättigt: a) CD3-PE und CD66b-FITC um CD3+ T-Zellen und CD66+ Neutrophile Granulozyten zu sortieren und b) CD19-FITC, CD16-PE und CD56-PE um CD19+ B-Zellen, CD16+ und/oder CD56+ NK-Zellen zu trennen. Das Sortierfenster wurde auf Seitwärtsstreuung versus spezifische Fluoreszenz eingestellt. Der Sortiervorgang wurde mittels „FACS Vantage sorter“ mit „Enterprise 621 single laser“ durchgeführt.

Tabelle 6: Oberflächenmarker zur Differenzierung und Trennung

Zelltyp	Cluster of Differentiation
B-Lymphozyten	CD19
T-Lymphozyten	CD3
NK-Zellen	CD16, CD56
Granulozyten	CD66b

Tabelle 7: Reinheitsgrad der sortierten Zellen

Zelltyp	T-Zellen	B-Zellen	NK-Zellen	Granulozyten
Probenanzahl	8	6	6	5
Reinheitsgrad >	96%	95%	94%	93%

2.2.2 Dextran-Separierung

10 ml Heparinblut wurden mit 2 ml Dextranlösung (steril, 4°C, 5%) versetzt und zur Sedimentation über 40 min bei Zimmertemperatur stehen gelassen. Danach wurde der Überstand abgehoben und über 6 min bei 1100 rpm zentrifugiert. Der Überstand nach Zentrifugation wurde wiederum abgehoben und verworfen.

Zum Pellet wurden anschließend 10 ml Lyse-Puffer (1 x) gegeben und über 5 min bei Raumtemperatur gelöst. Es erfolgte ein weiterer Zentrifugationsschritt über 6 min bei 1100 rpm.

Der Überstand wurde nochmalig abgenommen und verworfen und das resultierende Pellet sogleich weiterverarbeitet.

2.2.3 DNA-Extraktion

1. Zum aus der Dextraneparierung gewonnenen Zellpellet wurden 1 Volumen STE (20°C), 1/50 Volumen Proteinase K (20 mg/ml, 20°C) und 1/20 Volumen SDS (10%, 20°C) gegeben und leicht gemischt.
2. Der Verdau fand über Nacht bei 55°C statt.
3. Zum Verdau wurden 1 Volumen Phenol (4°C) gegeben und 10 min mittels Reagenzglas-Rotator vermischt.
4. Anschließend wurden die Proben bei 1200 rpm für 20 min zentrifugiert und die Arbeitsschritte 3+4 mit dem Überstand wiederholt.
5. Zur Entfernung des Phenols wurde 1 Volumen Chloroform-Isoamylalkohol (24:1, 20°C) zum Überstand gegeben und analog zum oben aufgeführten Schritt, 10 min vermengt.
6. Anschließend erfolgte ein erneuter Zentrifugationsschritt der Proben bei 1200 rpm für 20 min und die Wiederholung der Arbeitsschritte 5 + 6 mit dem Überstand.
7. Zur Fällung der DNA erfolgte der Versatz der Proben mit 1/10 Volumen Na-Acetat (3 M, 20°C), 2 Volumen Ethanol (100%, -20°C) und zur Präzipitation und besseren Sichtbarmachung bei geringen Mengen von DNA mit 1 µl Glycerol (Gibco).
8. Die DNA-Lösung wurde 5 min im Reagenzglasrotator vermischt und anschließend für 15 min bei 13000 rpm zentrifugiert und der Überstand abpipettiert.
9. Das DNA-Pellet wurde zum Entsalzen mit 200 µl Ethanol (70%, 4°C) gewaschen und für 5 min bei 13000 rpm zentrifugiert.
10. Die Trocknung des DNA-Sediments erfolgte bei Zimmertemperatur ein bis zwei Stunden.
11. Das gewonnene DNA-Pellet wurde, je nach Menge, in 20-500 µl TE-Puffer (pH 8,0/20°C) gelöst und bei 4°C gelagert.

2.2.4 DNA-Konzentrationsbestimmung

Ein Aliquot der zu messenden DNA-Lösung wurde mit Aqua dest. oder TE-Puffer 1:50 bis 1:100 verdünnt. Die Bestimmung der DNA-Konzentration erfolgte spektrophotometrisch (Quarzküvette, 1 cm Schichtdicke) durch Messung der Absorption bei einer Wellenlänge von 260 nm. Die Extinktion von 1 entspricht bei doppelsträngiger DNA ungefähr einer Konzentration von 50 µg/ml (Sambrook et al. 1989). Um den Reinheitsgrad der DNA-Lösung zu ermitteln, wurde der Quotient der Extinktionen bei OD260/OD280 bestimmt. Da erfahrungsgemäß die Werte durch Verunreinigung oder gerätespezifische Fehler beeinflusst werden, wurden zur Kontrolle alle DNA-Proben auf ein 0,7% Agarose-Gel aufgetragen, um grobe Abweichungen auszuschließen.

Tabelle 8: Agarose-Gele

Reagenz	DNA-Übersicht - 0,7%	PCR-Produkte – 3%
2/3 Nusive, 1/3 Agarose	0,7 g	3 g
TAE-Puffer (1 x)	100 ml	100 ml
Ethidiumbromid	5 µl	5 µl

2.2.5 Das Prinzip der konventionellen PCR

Die PCR (Polymerase Chain Reaction) dient der exponentiellen Vervielfältigung von DNA-Abschnitten. Zunächst benötigt man komplementäre Oligonukleotide, sogenannte Primer, die 5' bzw. 3' des codierenden Abschnittes binden müssen. Dabei liegt jeweils eine der Primerbindungsstellen auf einem der komplementären DNA-Einzelstränge. Somit dient jeder Einzelstrang auch als Vorlage (*template*) zur Vervielfältigung. Der erste Schritt der PCR besteht in der Denaturierung der doppelsträngigen DNA in Einzelstränge. Den zweiten Schritt bezeichnet man als Annealingphase, in der sich die Primer an die komplementären Basenabschnitte anlagern. Die eigentliche Amplifikation findet im dritten Schritt durch eine thermostabile Polymerase, ausgehend von den Primerbindungsstellen, statt. Diese spezielle Polymerase wird aus thermophilen Bakterien gewonnen (Saiki et al. 1988). Gestoppt wird die Extensionsphase durch erneutes Erhitzen und die Trennung der Doppelstränge. Ab dem dritten Zyklus wird die DNA dann exponentiell vervielfältigt, wobei sich die Reaktionskinetik nach ca. 40 Zyklen u.a. durch verbrauchte Primer, dNTP's und Funktionsverlust der Polymerase einem Plateau nähert. Den genauen Ablauf von Erhitzen und Abkühlung steuert ein Thermalcycler.

2.2.6 Echtzeit-Fluoreszenz-PCR via TaqMan

Die Echtzeit-Fluoreszenz-PCR basiert auf der konventionellen PCR. Mit ihr ist es möglich, schnell und kostengünstig, quantitative Ergebnisse zu erhalten. Auch hier wird die gewünschte Sequenz mittels spezifischer Primer und einer speziellen Taq-Polymerase exponentiell vervielfältigt. Diese Amplifikation findet innerhalb eines Thermalcyclers statt.

Den entscheidenden Fortschritt dieses Systems stellt jedoch die Einführung einer markierten Sonde dar. Hierdurch konnte man Vervielfältigung und Nachweis der PCR-Produkte simultan in einem Reaktionsgefäß durchführen. Die von Lee et al. 1993 entwickelte Methode basiert auf sogenannten fluorogenen Sonden. Diese Oligonukleotide sind 5' mit einem Reporterfarbstoff, in diesem Fall FAM und 3' mit einem Quencherfarbstoff (TAMRA) markiert. Die Sonde sollte so konstruiert sein, dass sie zwischen den Primersequenzen liegt. Zwischen Reporter und Quencher existiert ein Fluoreszenz-Energietransfer (FET), so dass das vom Reporter emittierte Lichtsignal vom Quencher, durch dessen räumliche Nähe, unterdrückt wird. Für die PCR macht man sich die 5'-3'-Exonuklease-Aktivität der Taq-Polymerase zunutze, die gebundene Sonden hydrolysiert und somit den Unterdrückungseffekt des Quenchers aufhebt. Der durch einen Laser angeregte Reporterfarbstoff kann nun ungehindert das Lichtsignal emittieren. Die Spezifität bleibt dadurch gewährleistet, dass nur gebundene Sonden von der Taq-Polymerase hydrolysiert werden und eine Extension gebundener Sonden, mittels Blockade des 3'-Endes durch einen Phosphatrest, verhindert wird. Durch die Anhäufung von PCR-Produkten steigt das Fluoreszenz-Signal des Reporters mit jedem Zyklus an. Dieses kann dann mittels des „ABI PRISM Sequence Detection System“ bzw. dessen CCD-Kamera detektiert und aufgezeichnet werden.

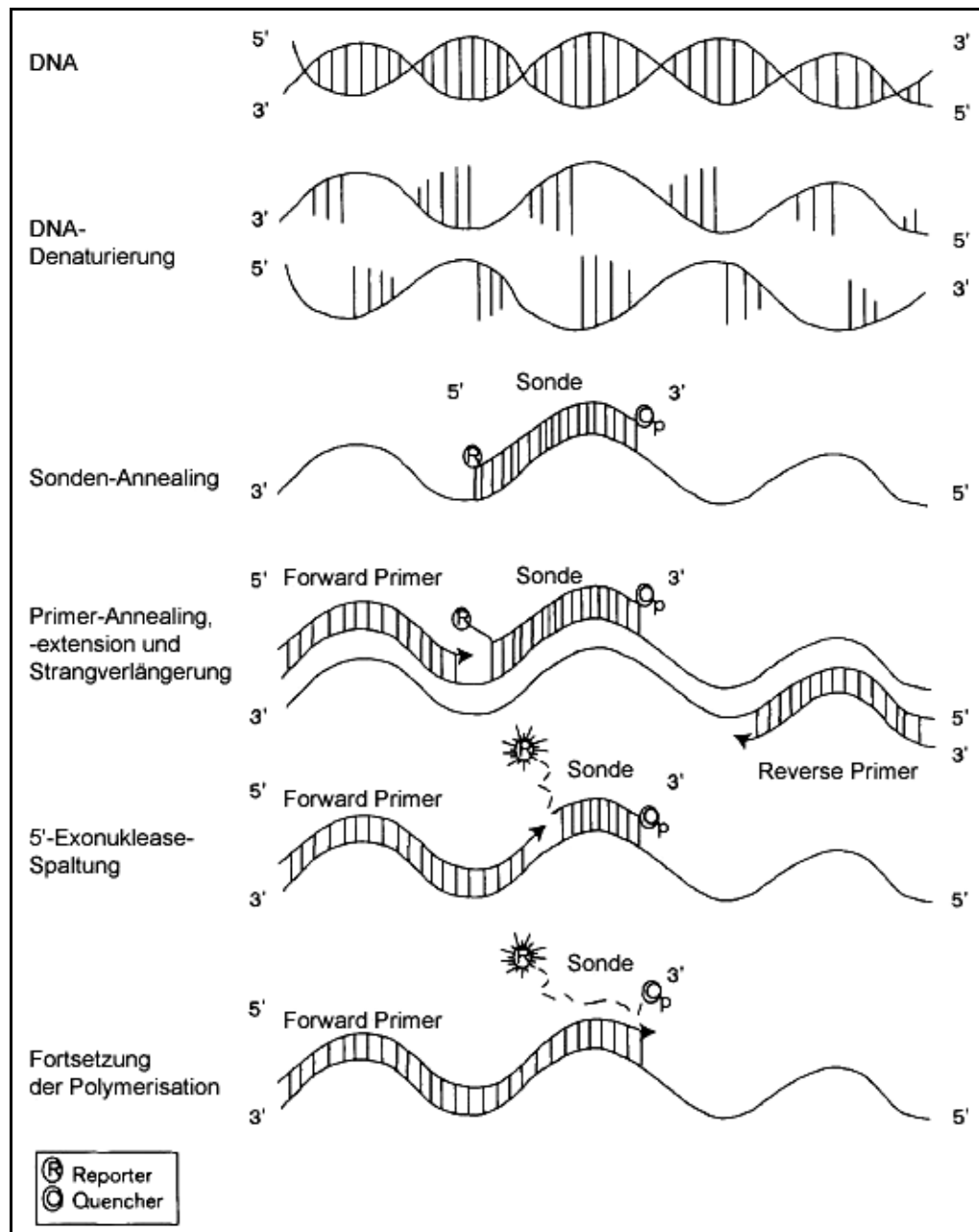


Abb. 5: Schematische Darstellung der Schritte einer typischen TaqMan-Reaktion (Quelle: Lie et al. 1998)

Das ABI PRISM 7700 Sequence Detection System:

Das 7700 SDS ist ein Thermalcycler mit optischem Heizdeckel. Über jeder der 96 möglichen Positionen befindet sich eine Linse, die das von einem Argonlaser ($\lambda = 488 \text{ nm}$) emittierte Licht in das Reaktionsgefäß leitet. Der Strahl des Lasers wird über einen dichroidischen Spiegel zu einem Multiplexer umgeleitet und von dort über Glasfasern und optischen Heizdeckel zu jeder

einzelnen Probe gesandt. Der Reporterfarbstoff der Sonde wird zur Fluoreszenzemission mit spezifischer Wellenlänge angeregt, welche über dieselbe Glasfaser zum dichroidischen Spiegel geleitet und dort reflektiert wird. Im weiteren Verlauf, wird das Licht durch eine Linse neu fokussiert, über einen Spektrographen geleitet und schließlich von einer CCD-Kamera detektiert und in ein digitales Signal umgewandelt. Als Reaktionsgefäße werden solche ohne störende Autofluoreszenz benötigt. Die komplette Steuerung des Systems erfolgt über einen Power Macintosh 7200 der Firma Apple.

Tabelle 9: TaqMan PCR-Mix

Reagenz	Konzentration	Menge
5' Primer	10 μ M	2,5 μ l
3' Primer	10 μ M	2,5 μ l
Sonde	10 μ M	0,5 μ l
dNTP	2,5 mM	4,0 μ l
10 x PCR-Puffer (Gibco GBR)		5,0 μ l
TE-Puffer (pH 8,0)		0,8 μ l
MgCl ₂	50 mM	4,5 μ l
Gibco-Taq-Platinum-Polymerase		0,25 μ l
DNA-Probe		2,0 μ l
Aqua dest.		27,95 μ l
Gesamt		50,0 μ l

Tabelle 10: TaqMan PCR-Programm

Programm	Zeit und Temperatur
Initiale Denaturierung	5 min bei 95°C
Denaturierung*	1 min bei 95°C
Annealing/Extension*	1 min bei 64°C
Zyklen (für mit * gekennzeichnete Schritte)	45
Abkühlung	4°C

2.2.7 Die Multiplex-nested-PCR

Die Multiplex-nested-PCR setzt sich aus zwei aufeinander folgenden PCR-Reaktionen zusammen. Dabei wird die nested-PCR mit Primern, die innerhalb der zuvor amplifizierten Sequenz liegen, durchgeführt.

Die erste Runde der nested-PCR mit 50 µl Gesamtvolumen wurde mit 325 ng, 1300 ng sowie 3250 ng DNA bei Leukozyten aus peripherem Blut bzw. 65 ng bei Thymozyten und sortierten Zellen angesetzt und mit den 5'Primern $\delta\text{Rec}2.1(-102)$ und $\delta\text{Rec}2.4(-79)$ sowie drei 3'Primern, $\text{D}\delta 3(+180)$, $\text{J}\delta 1(+155)$ und $\psi\text{J}\alpha(+208)$ gestartet (übrige Reagenzien siehe Tabelle 11). Da sich alle $\delta\text{Rec}2$ -Elemente relativ nahe beieinander zu einem Cluster gruppieren, wurden in der ersten Runde der PCR alle sich 3' von $\delta\text{Rec}2.1$ befindlichen Rekombinationselemente in Umlagerung mit $\text{D}\delta 3$, $\text{J}\delta 1$ und $\psi\text{J}\alpha$ amplifiziert.

Die zweite Runde, mit ebenfalls 50 µl Gesamtvolumen, wurde mit 0,5 µl PCR-Produkt aus der ersten Runde, den 5'nested Primern $\delta\text{Rec}2.1$, $\delta\text{Rec}2.2$, $\delta\text{Rec}2.3$, $\delta\text{Rec}2.4$, $\delta\text{Rec}2.5$, $\delta\text{Rec}2.6$, $\delta\text{Rec}2.7$, $\delta\text{Rec}2.8$ sowie den 3'nested Primern $\text{D}\delta 3(+77)$, $\text{J}\delta 1(+102)$ und $\psi\text{J}\alpha(+126)$ durchgeführt. Für jede Multiplex-PCR aus der ersten Runde wurden 24 spezifische PCRs angesetzt. Um Kontaminationen durch PCR-Reagenzien auszuschließen, liefen jeweils Negativ-Kontrollen (ohne Amplifikationsmaterial) parallel zu den Proben. Die PCR-Produkte wurden auf einem 3% Agarose-Gel mittels Gel-Elektrophorese und Ethidium-Bromid als Farbstoff analysiert.

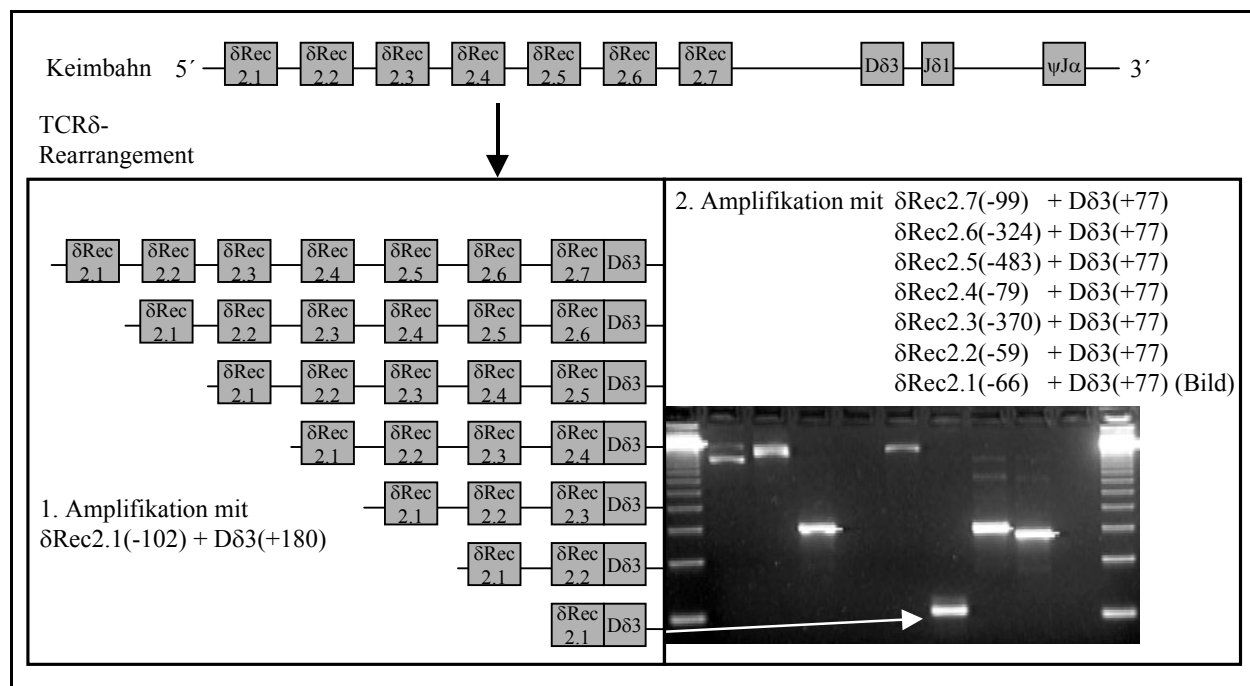


Abb. 6: Prinzip der Multiplex-nested-PCR am Beispiel von $\delta\text{Rec}2\text{-D}\delta 3$. Analog zum linken Bildteil, wurden in der 1. PCR auch $\delta\text{Rec}2\text{-J}\delta 1$ - und $\delta\text{Rec}2\text{-}\psi\text{J}\alpha$ -Umlagerungen zusammen mit $\delta\text{Rec}2\text{-D}\delta 3$ amplifiziert. Danach wurden ebenfalls jeweils sieben spezifische PCR mit denselben 5'-Primern und den nested J δ 1- bzw. $\psi\text{J}\alpha$ -3'-Primern angesetzt.

Tabelle 11: Multiplex-nested-PCR-Mix

Reagenz	Konzentration	Menge
5' Primer	10 μM	1,25 μl
3' Primer	10 μM	1,25 μl
dNTP	2,5 mM	4,0 μl
10 x PCR-Puffer		5,0 μl
Ampli-Taq-Polymerase (Perkin Elmer Cetus)		0,25 μl
DNA-Probe	Menge je nach Konzentration	
Aqua dest.	bis Gesamtvolumen von 50,0 μl	
Gesamt		50,0 μl

Tabelle 12: Multiplex-nested-PCR Programme

Programm	1. Runde der Multiplex-nested-PCR	2. Runde der Multiplex-nested-PCR
Initiale Denaturierung	5 min bei 94°C	5 min bei 94°C
Denaturierung*	1 min bei 94°C	1 min bei 94°C
Annealing*	1 min bei 60°C	1 min bei 60°C
Extension*	2 min bei 72°C	2 min bei 72°C
Zyklen (für mit * gekennzeichnete Schritte)	35	25
Inkubation	5 min bei 72°C	5 min bei 72°C
Abkühlung	4°C	4°C

2.2.8 Nachweis der PCR-Produkte

7 µl des PCR-Produkts aus der 2. Runde wurden mit 2 µl Gel-Ladepuffer auf ein 3% Ethidiumbromid-Agarose-Gel aufgetragen und elektrophoretisch, für ca. 1 h bei 70 Volt aufgetrennt. Anschließend erfolgte die Belichtung und Sichtbarmachung der DNA-Banden unter UV-Licht sowie die Bildausgabe.

2.2.9 Sequenzierung der PCR-Produkte

Ausgewählte PCR-Produkte wurden entweder kloniert (TA-EASY Cloning Vector) oder direkt sequenziert. Pro neuer Umlagerungsstelle erfolgte mindestens je eine Sequenzierung von Rearrangements mit D83, J81 und ψ J α . Die Sequenzierungsreaktion wurde mit den 5'-Primern M13, D83(+33), D83(+77), J81(+62) oder ψ J α (+126) gestartet. Die Sequenzierung selbst erfolgte durch die Firma AGOWA nach der dideoxy-Methode von Sanger mit fluoreszenzmarkierten Sonden auf einem ALF-Sequencer.

2.2.10 Statistische Verfahren

Häufigkeitsberechnung der Rearrangements:

Die Berechnung der Umlagerungsfrequenz auf 10^6 Zellen erfolgte nach einer Formel für Binomialverteilungen.

X = Umlagerungsfrequenz

N = analysierte Zellen

$P\alpha$ = Prozentsatz positiver Proben

Ausgangsformel:
$$P\alpha = \frac{N!}{\alpha!(N-\alpha)!} (x)^\alpha (1-x)^{N-\alpha}$$

für null Erfolge: ($\alpha = 0$):
$$P\alpha = (1-x)^N$$

umgestellt nach x :
$$x = 1 - (1 - P_\alpha)^{\frac{1}{N}}$$

Fisher-Test:

Testsituation: Zwei unabhängige Stichproben mit zwei dichotomen Gesamtheiten

Testidee: Der Fisher-Test ist eine Sonderform des $[\chi]^2$ -Test, insofern ein Anpassungstest. Mit dem Fisher-Test lässt sich eine Vierfelderverteilung prüfen, auch wenn die Stichprobe und damit die erwarteten Häufigkeiten klein sind. Mit Hilfe der hypergeometrischen Verteilung, die für diskrete Variablen definiert ist, kann man exakt die Wahrscheinlichkeit bestimmen, mit der bei gegebenen univariaten Randverteilungen eine bestimmte Häufigkeitsverteilung in den vier Feldern der Tabelle auftritt.

a	b	r_1
c	d	r_2
c_1	c_2	n

Formel:
$$p = \frac{(r_1!r_2!c_1!c_2!)}{n!a!b!c!d!}$$

Bei einem Signifikanzniveau von 5%, d.h. einem p (0,05), wird die Nullhypothese nicht verworfen.

3 Ergebnisse

3.1 Untersuchung von δ Rec2-Rearrangements und deren Quantifizierung

3.1.1 Identifikation des δ Rec2.1-2.7-Clusters

Durch die vorangegangenen Arbeiten war das δ Rec2.1-Element hinreichend bekannt. Während der Etablierung der PCR und ersten Tests an Leukozyten von zehn gesunden Individuen wurden nach 35 Zyklen PCR keine weiteren Amplifikationsprodukte beobachtet. Überraschenderweise konnten nach einer zweiten PCR-Reaktion (siehe Abschnitt 3.2.7) mit jeweils intern gelegenen Primern zusätzlich zu den erwarteten Banden, die δ Rec2.1-Rearrangements repräsentierten, verschiedene größere Banden beobachtet werden.

Die erhaltenen PCR-Produkte wurden entweder in einen Vektor kloniert oder direkt als PCR-Produkt sequenziert. Die Sequenzanalysen unter Benutzung des BLASTn- Programms (Altschul et al. 1990) zeigten, dass es sich hierbei um neue, vorher nicht beschriebene Rearrangements mit D δ 3, J δ 1 und Ψ J α handelte. Die Umlagerungsstellen konnten 2,6-5,2 kb strangabwärts von V δ 2 bestimmt werden (GeneBank-Zugriffsnummer HUAE000661). 5' bzw. 3' zwischen den rearrangierten Genelementen wurden N-Nukleotidinsertionen, -deletionen und in einigen Proben D δ 3-Segmente gefunden, was zeigt, dass diese Umlagerungen unter Einfluß der V(D)J-Rekombinase zustande kamen. Diese *TCRD*-Genregionen wurden noch nie zuvor als Umlagerungsstellen für Rearrangements beschrieben. Es konnte kein sogenannter *open reading frame* strangaufwärts von δ Rec2 und keine Homologie zu bekannten ähnlichen *TCRD*-Elementen, wie δ Rec, festgestellt werden. Auf Basis der Sequenzanalyse und der Nukleotid-Sequenz, welche von Boysen et al. 1997 publiziert wurde, konnte eine neue Genkarte für den *TCRD*-Genabschnitt erstellt werden.

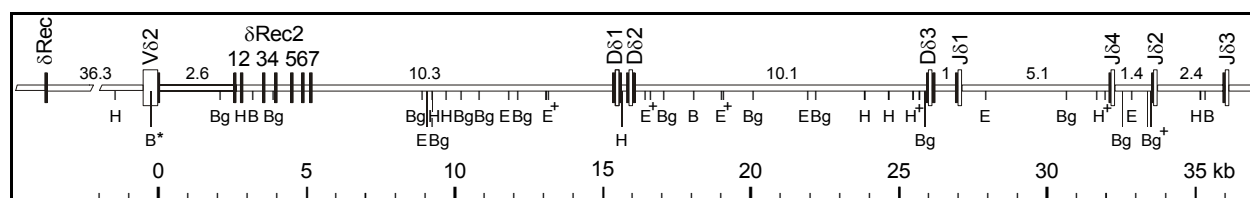


Abb. 7: Genkarte, beschränkt auf die Region V δ 2 bis J δ 3 des *TCRD*, inklusive des δ Rec2.1-2.7-Clusters (B, Bg, E, E+, H, H+ = Restriktionsenzymchnittstellen)

3.1.2 Analyse via Real-Time-PCR

Es wurden zunächst drei ausgewählte δ Rec2-Rearrangements bei Gesunden mittels Echtzeit-PCR nach dem in Abschnitt 3.2.6 beschriebenen Protokoll analysiert. Zu Beginn erfolgte die Erstellung von Ausgangslösungen für das Anlegen einer Standardreihe. Es wurden δ Rec2.2-, δ Rec2.3- und δ Rec2.4-D δ 3-Inserts aus M13-Plasmiden hochamplifiziert (PCR-Bedingungen siehe Tabelle 10). Die Primer waren 5' δ Rec2.2, δ Rec2.3, δ Rec2.4 und 3' D δ 3(+77). Drei PCR-Ansätze (Tabelle 9) pro Umlagerungselement wurden amplifiziert, auf ein PCR-Gel (Tabelle 8) aufgetragen und später eluiert (Qiagen-Gel-Extraktion-Kit). Des Weiteren wurden zu den Umlagerungen δ Rec2.2, 2.3 und 2.4 mit D δ 3 Verdünnungsreihen für die Standards erstellt. Dies erfolgte zunächst sowohl für die Plasmide als auch für die reinen PCR-Produkte, um die, für Messungen am TaqMan, geeignetere Standardreihe zu bestimmen.

3.1.2.1 Erstellung und Nachweis der Standardreihen

Für die Quantifizierung von DNA-Abschnitten sind Standardreihen essentiell. Hierzu benötigt man eine sequenzspezifische Standardreihe, die aus Zielsequenzen bekannter Konzentration erstellt wird und eine Standardreihe für ein Referenzgen. Die Sequenzen werden in logarithmischen Stufen von 10^7 Kopien bis 10 Kopien herunterverdünnt.

β -Aktin-Standardreihe:

Die β -Aktin-Sequenz kommt in jeder Zelle zweimal vor und ist somit ein verlässlicher Parameter bei der Quantifizierung. Dieses Referenzgen gehört zu den Homöostasegenen, die nicht von Krankheiten beeinflusst werden sollten. Um verschiedene Proben miteinander vergleichen zu können, sollte immer der Quotient aus Zielsequenz- und Referenzgenmenge gebildet werden. Insofern fungiert der β -Aktin-Standard als interne Kontrolle, um sicherzustellen, dass die Quantifizierung der verschiedenen Umlagerungen nicht durch DNA-Mengenschwankungen oder Proben-Differenzen bezüglich der PCR-Inhibition beeinflusst wird.

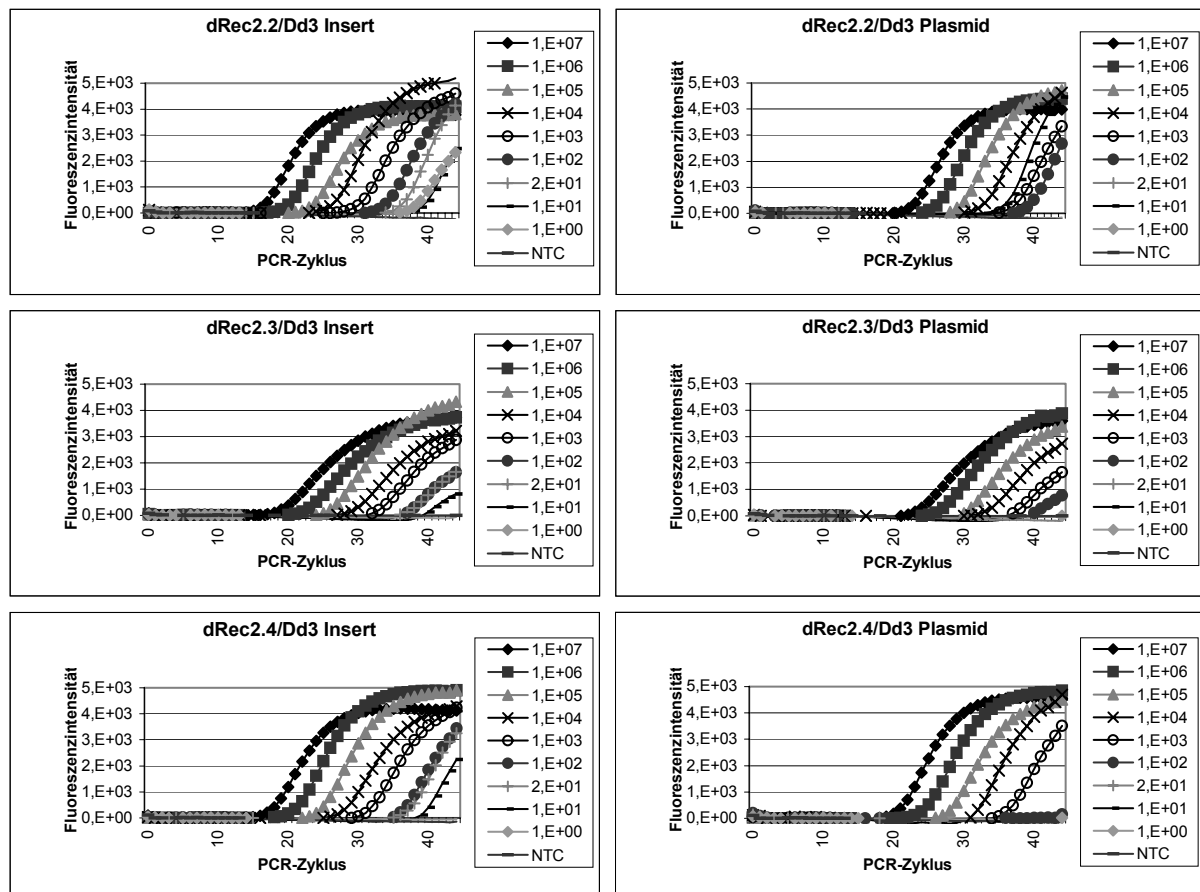
δ Rec2.2-2.4- D δ 3-Standardreihen:

Wie aus Tabelle 13 zu entnehmen ist, lag der C(t)-Wert (*copy-threshold* = Schwellenwert, ab dem die Amplifikation exponentiell verläuft) aller Plasmidverdünnungen kontinuierlich drei bis sechs Zyklen hinter den reinen PCR-Produkten (Inserts). Daraus war abzuleiten, dass entweder die Plasmide schlechter amplifiziert wurden oder die Konzentrationsmessung der

Ausgangslösungen für die Verdünnungsreihen schon fehlerhaft war. Der Gelauftrag der PCR-Produkte bestätigte die erhaltenen Werte nochmalig (siehe Abb. 8). Aus diesem Grund wurden die Inserts für die spezifische Standardreihe bevorzugt, um hiermit die Kopienzahl der Proben zu ermitteln.

Messungen einer anderen Arbeitsgruppe mit Plasmiden, die mittels Restriktionsenzymen linearisiert wurden, zeigten, dass diese circa 4 Zyklen eher ihren C(t)-Wert erreichten. Dies entspricht in etwa der gemessenen C(t)-Differenz zwischen Plasmid und Insert. Bestätigung erfuhren diese Messungen noch dadurch, dass die C(t)-Werte nach anschließender Ligation annähernd dieselben wie vor der Linearisierung waren (Ergebnisse nicht gezeigt).

Tabelle 13: Standardreihen der δ Rec2.2-, δ Rec2.3- und δ Rec2.4-D δ 3-Rearrangements nach Amplifikation im TaqMan. Deutlich zu sehen ist der Amplifikationsvorteil der Inserts bzw. reinen PCR-Produkten gegenüber den Plasmiden. Legende: eingesetzte Kopienzahlen + NTC (Negativkontrolle)



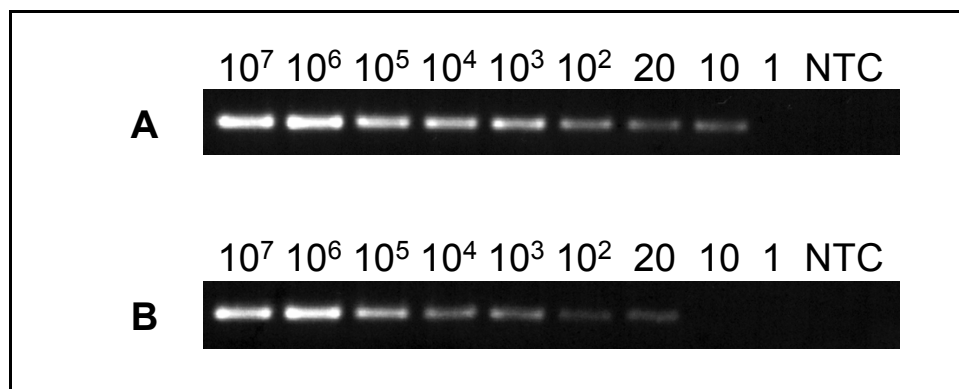
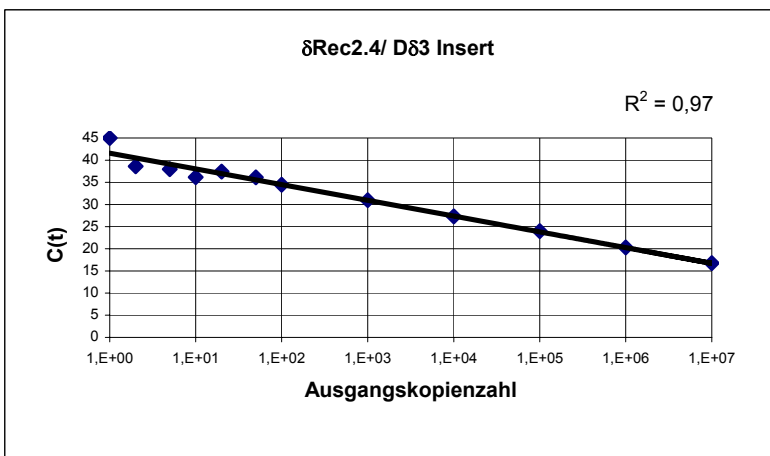
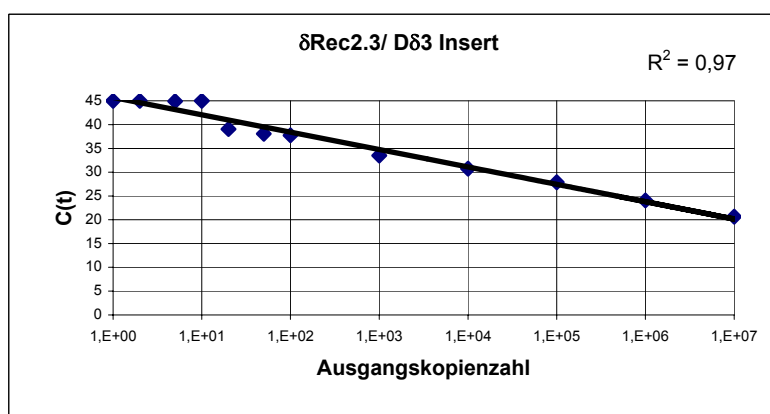
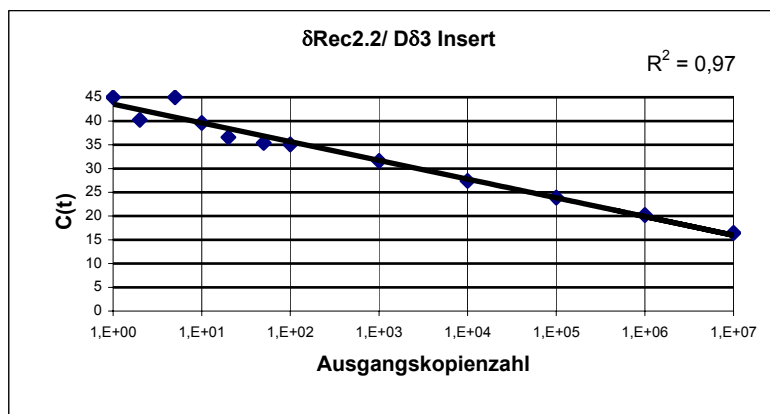


Abb. 8: A: δ Rec2.2-D δ 3-Standardreihe aus Inserts, B: δ Rec2.2-D δ 3 Standardreihe aus Plasmiden
Zu sehen ist die für die PCR eingesetzte Kopienzahl und die Nullkontrolle (NTC).

Tabelle 14: C(t)-Werte der Standardreihen aus Inserts für δ Rec2.2-D δ 3, δ Rec2.3-D δ 3 und δ Rec2.4-D δ 3

Kopienzahl	δ Rec2.2-D δ 3	δ Rec2.3-D δ 3	δ Rec2.4-D δ 3
1,00E+07	16,45	20,64	16,78
1,00E+06	20,22	24,06	20,31
1,00E+05	23,88	27,89	23,99
1,00E+04	27,41	30,75	27,30
1,00E+03	31,60	33,50	30,96
1,00E+02	35,06	37,75	34,46
50	35,39	38,08	36,14
20	36,57	39,07	37,44
10	39,61	45,00	36,16
5	45,00	44,92	37,97
2	40,25	45,00	38,62
1	45,00	45,00	45,00
NTC	45,00	45,00	45,00

Tabelle 15: Standardgeraden der Verdünnungsreihen $\delta\text{Rec2.2-}$, $\delta\text{Rec2.3-}$ und $\delta\text{Rec2.4-D}\delta 3$ nach Amplifikation mittels TaqMan. Die Ausgangskopienzahl der einzelnen Standardproben wurde gegen den entsprechenden Schwellenzyklus (C(t)-Wert) aufgetragen. Durch die Punkte wurde eine Standardgerade gelegt. R^2 gibt an, wie genau die einzelnen Punkte auf der Standardgeraden liegen.



Um herauszufinden, bis zu welcher Kopienzahl die Standardreihen verlässliche Werte liefern und weil die zu erwartende Frequenz an Amplifikaten relativ niedrig war, erfolgte die Erstellung weiterer Standardreihen von $\delta\text{Rec2.2-}$, $\delta\text{Rec2.3-}$ und $\delta\text{Rec2.4-D}\delta 3$. Die Standardreihen wurden nochmalig aus den Ausgangslösungen auf folgende Konzentrationen bzw. Kopienzahlen verdünnt: 10^7 , 10^6 , 10^5 , 10^4 , 10^3 , 10^2 , 50, 20, 10, 5, 2, 1. Besonders ab 100 Kopien abwärts waren die Schwankungen jedoch so groß, dass diese Konzentrationen für Analysen nicht verwertbar waren (siehe Tabellen 14 und 15). Die Messungenauigkeit hätte somit die normalen Kopienzahldifferenzen überlagert und eine quantitative Aussage unmöglich gemacht.

3.1.2.2 Probenmessungen

Um zu überprüfen, ob die Standardreihen zuverlässig funktionierten, wurden fünf Proben vorab untersucht, wobei jedoch große Schwankungen in der Kopienzahl gemessen wurden. Außerdem wurden diese Proben, nach Amplifikation, zu Kontrollzwecken auf ein Gel aufgetragen. Hier zeigte sich, dass neben spezifischen Banden für $\delta\text{Rec2.4-D}\delta 3$ auch spezifische für $\delta\text{Rec2.5-D}\delta 3$ und unspezifische Banden zu sehen waren (Abb. 9).

Dies ist nur durch die relative Nähe der Umlagerungselemente zueinander zu erklären. Innerhalb des Clusters ist der Abstand der Rekombinationselemente meist nicht größer als 200 bp. Das wäre im besten Falle durch eine Messung, bei der beide erhaltenen Werte voneinander subtrahiert werden, auszugleichen. So könnte man die ermittelte Kopienzahl für $\delta\text{Rec2.3-D}\delta 3$ von der für $\delta\text{Rec2.2-D}\delta 3$ abziehen und erhielte die tatsächliche Zahl an $\delta\text{Rec2.2-D}\delta 3$ -Rearrangements. Hierfür fehlt dem Verfahren jedoch die nötige Sensitivität, wie aus den Standardreihenmessungen bei unter 100 Kopien abzuleiten ist, da die Kopienzahlschwankungen geringer als der Messfehler zu erwarten wären.

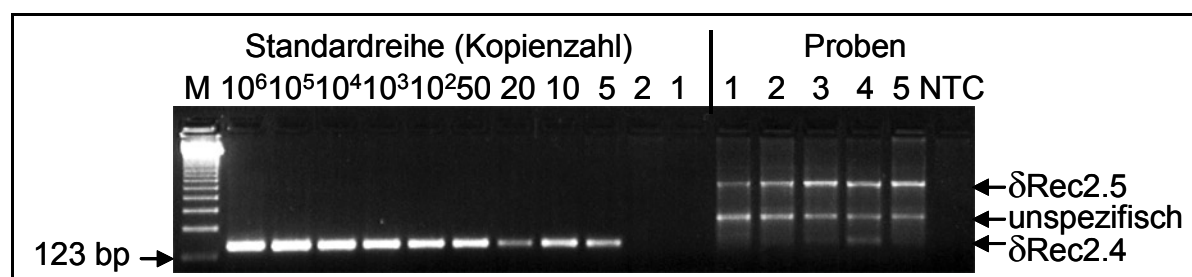


Abb. 9: Standardreihe des $\delta\text{Rec2.4-D}\delta 3$ -Rearrangements und fünf Proben nach Amplifikation im TaqMan. M: 123 bp Molekulargewichtsmarker, NTC: Negativkontrolle. Die PCR wurde mit den Primern $\delta\text{Rec2.4(-79)}$ und $\text{D}\delta 3(+77)$ durchgeführt.

3.1.2.3 Fazit der Messungen mittels Echtzeit-PCR

Der zunächst viel versprechende Ansatz, die Kopienzahl von δ Rec2-Umlagerungen mittels einer relativ arbeitssparenden Technik zu bestimmen, gelang aus folgenden Gründen nicht:

- Die Sensitivität im unteren Kopienzahlbereich war relativ schlecht, so dass es, besonders im für die Aufgabenstellung relevanten Nachweisbereich von unter 100 Kopien auf 1×10^6 Zellen, zu erheblichen Schwankungen bei wiederholten Messungen kam.
- Eine hohe Spezifität war nicht gegeben, da beispielsweise eine Amplifikation von δ Rec2.2-D δ 3 auch zur Amplifikation und vor allem Detektion aller Umlagerungen mit nahe 3' von δ Rec2.2 gelegenen Erkennungssequenzen des Clusters führte. Auch eine angedachte subtraktive Messung, bei der man dieselbe Prozedur mit δ Rec2.3-D δ 3 durchführt, die erhaltene Kopienzahl von der ersten Messung abzieht und so die tatsächliche Anzahl von δ Rec2.2-D δ 3-Rearrangements erhält, konnte aus anfangs genanntem Grund nicht verwirklicht werden.
- Letztendlich ist die Technik hervorragend zur Darstellung von Verläufen und Verhältnissen geeignet. Absolute Werte sind, besonders im unteren Kopienzahlbereich, kritisch zu bewerten. So kann man zwar im Logstufenbereich gut differenzieren, aber nur schwierig über Zwischenstufen Aussagen machen, was dadurch begründet ist, dass es sich hier um ein expotentiell Verfahren handelt.

3.1.3 Analyse via Multiplex-nested-PCR

Um trotz gescheiterter Analyse mittels Echtzeit-PCR zu einer quantitativen Aussage zu gelangen, wurden die Proben nach dem im Abschnitt 3.2.7 beschriebenen Protokoll analysiert. Die PCR-Produkte wurden folgendermaßen ausgewertet: Zunächst wurde die amplifizierte DNA auf ein Agarose-Gel (Tabelle 8) aufgetragen. Als positive Banden bzw. Rearrangements wurden nur die unmittelbar dem 5'-nested-Primer am nächsten liegende Umlagerungssequenz gewertet. Um zu wissen, welche Bandengröße mit welchem Rearrangement übereinstimmt, wurde mindestens eine Probe pro Bandengröße und Umlagerungselement sequenziert. Indirekt konnte man die Größe der Amplifikationsprodukte auch durch Berechnung der Primerdistanzen von der Verknüpfungsstelle ermitteln. Allerdings ist dies nur ein ungefährender Näherungswert, da die Produktgröße ebenso durch Nukleotidinsertion und -deletion sowie vorangegangene Rearrangements mit anderen Umlagerungselementen beeinflusst wird. Banden, die so nicht zuzuordnen waren, wurden immer sequenziert.

3.1.3.1 Rearrangements der δ Rec2.1-2.7-Elemente in peripheren Leukozyten

Es galt zu klären, ob die neu identifizierten Rearrangements an der Leukämogenese beteiligt sind und dort einen sogenannten gestörten Differenzierungsschritt darstellen oder aber auch bei Gesunden, als Zwischenschritt des normalen *TCRD*-Rekombinationsprozesses, zu finden sind. Dazu wurde DNA aus *buffy-coat* von zehn gesunden Spendern analysiert (siehe Aufgabenstellung und Material und Methoden). Die untersuchten Umlagerungselemente δ Rec2.1-2.7 waren in unterschiedlicher Häufigkeit mit den 3' gelegenen Rekombinationspartnern rearrangiert. Die Anzahl der Umlagerungen korrelierte hierbei gut mit der eingesetzten Zellzahl. Der Anteil der Proben, die positiv für ein bestimmtes Rearrangement waren, nahm mit der Menge der eingesetzten DNA ab, was zeigt, dass im überwiegenden Teil der Proben Einzelkopien des jeweils umgelagerten Allels vorhanden waren. Das Vorliegen einer Einzelkopie des rearrangierten Allels wurde durch die direkte Sequenzierung der PCR-Produkte, insbesondere der Verknüpfungsregionen, bestätigt. Eine weitere Analyse derselben DNA-Probe wies andere δ Rec2-Rearrangements auf. Auch wenn ein Rearrangement des gleichen δ Rec2-Elements nochmals amplifiziert wurde, zeigten die Verknüpfungsstellen meist differierende Sequenzen, was darauf hindeutete, dass es sich auch hierbei eher um Einzelzellen, als um eine monoklonale Zellexpansion handelte.

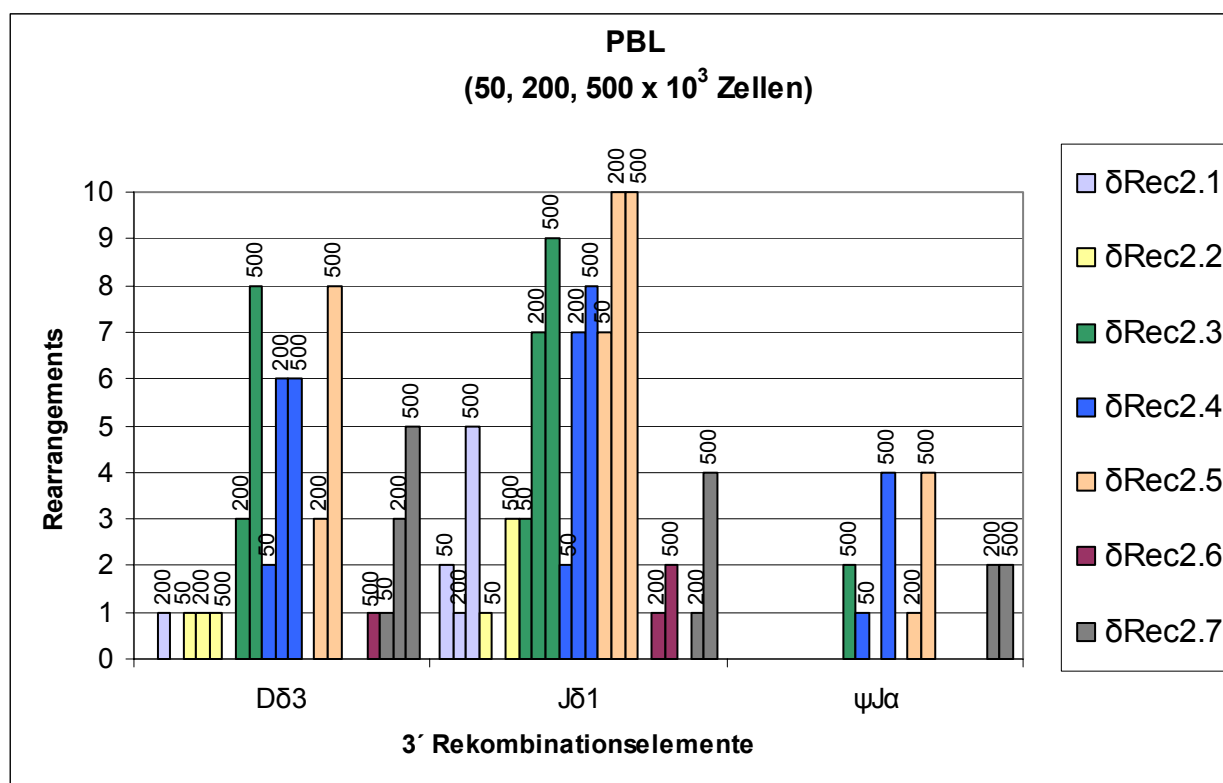


Abb. 10: Periphere Leukozyten: Übersicht der Anzahl der amplifizierten Rearrangements von $\delta\text{Rec}2.1-2.7$ mit D $\delta 3$, J $\delta 1$ und $\psi J\alpha$ mit 50, 200 und 500 x 10³ Zellen.

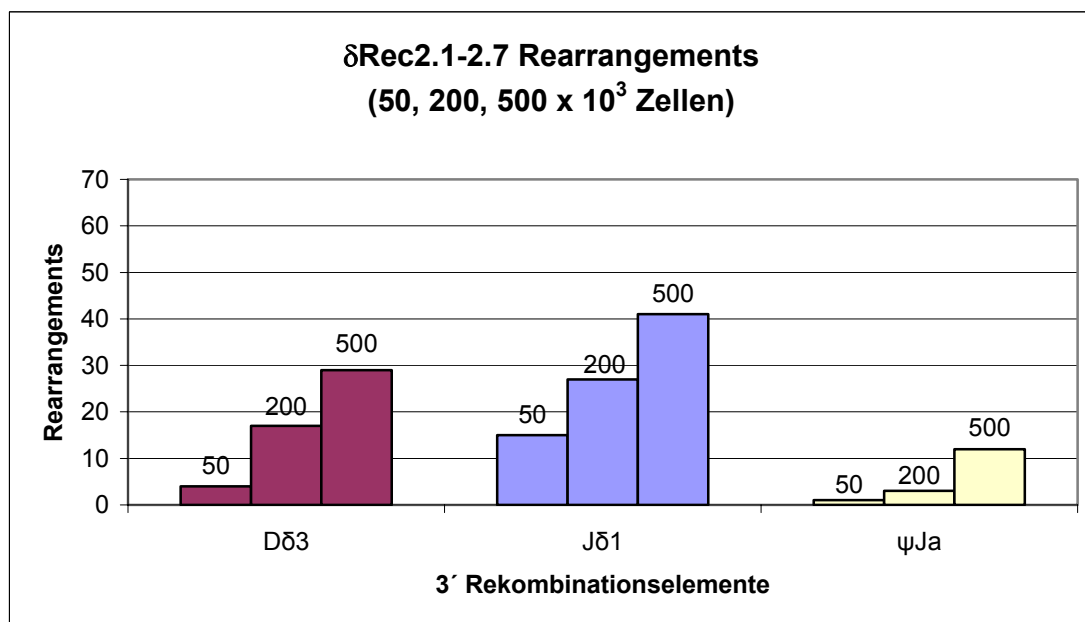


Abb. 11: Periphere Leukozyten: Zusammenfassung der Anzahl der amplifizierten Rearrangements von $\delta\text{Rec}2.1-2.7$ mit D $\delta 3$, J $\delta 1$ und $\psi J\alpha$ mit 50, 200 und 500 x 10³ Zellen.

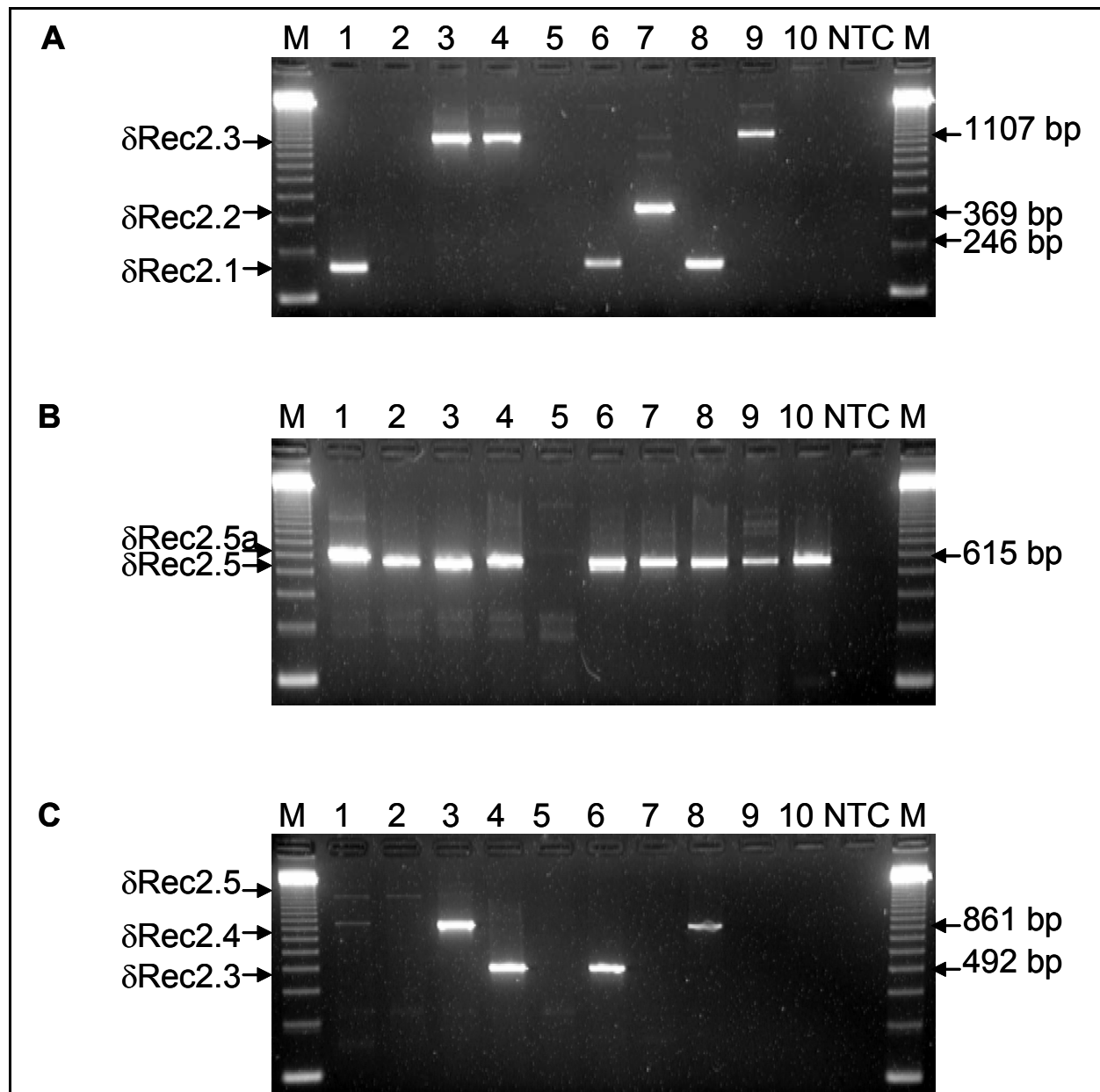


Abb. 12: PCR-Analysen von δ Rec2-Umlagerungen in peripheren Leukozyten A: δ Rec2-J δ 1 (50×10^3 Zellen), B: δ Rec2-D δ 3 (500×10^3 Zellen), C: δ Rec2- ψ J α (500×10^3 Zellen) M: 123bp Molekulargewichts-Marker, 1-10: Leukozytenproben, NTC: Negativkontrolle. Die nested-PCR wurde mit folgenden Primern durchgeführt: A: δ Rec2.1(-66) und J δ 1b(+102) B: δ Rec2.5(-483) und D δ 3(+77) C: δ Rec2.3(-370) und ψ J α (+128)

3.1.3.2 Quantifizierung der $\delta\text{Rec2.1-2.7}$ -Rearrangements

Da die eingesetzte DNA-Menge mit einer definierten Zellzahl (N) korrespondierte, konnte, basierend auf dem Prozentsatz (P) der positiven Proben, die Anzahl der Zellen, die ein bestimmtes Rearrangement besitzen, ermittelt werden. Hierzu wurde die im Methodenteil beschriebene Formel $x = 1 - (1 - P_\alpha)^{\frac{1}{N}}$ verwendet. Durch die Anwendung dieser Formel, die eine Transformation der Binomialverteilungsformel ist, konnte die Häufigkeit für jedes Rearrangement kalkuliert werden.

Subsumiert waren in PBL am häufigsten Rearrangements mit J δ 1 zu beobachten ($f = 38 \times 10^{-6}$). Rekombinationen des Clusters mit D δ 3 waren etwas rarer ($f = 11 \times 10^{-6}$), während solche mit $\Psi\text{J}\alpha$ -Elementen zu den selten zu detektierenden Ereignissen gehörten ($f = 3 \times 10^{-6}$). Rearrangements von $\delta\text{Rec2.5}$ mit J δ 1, zeigten mit Abstand die höchste Umlagerungsfrequenz in PBL ($f = 24 \times 10^{-6}$), gefolgt von $\delta\text{Rec2.4-J}\delta$ 1 und $\delta\text{Rec2.3-J}\delta$ 1 ($f = 6 \times 10^{-6}$). Die $\delta\text{Rec2.3-2.5}$ -Elemente, in der Mitte des Clusters, waren häufiger umgelagert als jene 5' und 3' davon.

3.2 Rearrangements der $\delta\text{Rec2.1-2.7}$ -Elemente in sortierten Zellpopulationen

Die sortierten Zellpopulationen wurden untersucht, um etwas mehr Einsicht in die biologische Bedeutung der δRec2 -Rearrangements zu bekommen. Um zu klären, ob, in Hinsicht auf die Umlagerungselemente, Zellspezifitäten bestehen, wurde die Frequenz von δRec2 -Rearrangements in sortierten PB-T-Lymphozyten, B-Lymphozyten, NK-Zellen und Neutrophilen Granulozyten verglichen. Es fand sich ein ähnliches Bild wie bei den unsortierten Zellen (PBL). Erwartungsgemäß wurden fast alle δRec2 -Rearrangements mit D δ 3, J δ 1 und $\Psi\text{J}\alpha$ bei T-Lymphozyten nachgewiesen. So betrug die Frequenz der detektierten Umlagerungen von δRec2 bei T-Zellen 326×10^{-6} mit J δ 1 und 55×10^{-6} mit D δ 3. Die RSS von $\delta\text{Rec2.5}$ stellte auch hier, wie bei den unsortierten peripheren Leukozyten, die häufigste Umlagerungsstelle mit J δ 1 dar ($f = 208 \times 10^{-6}$).

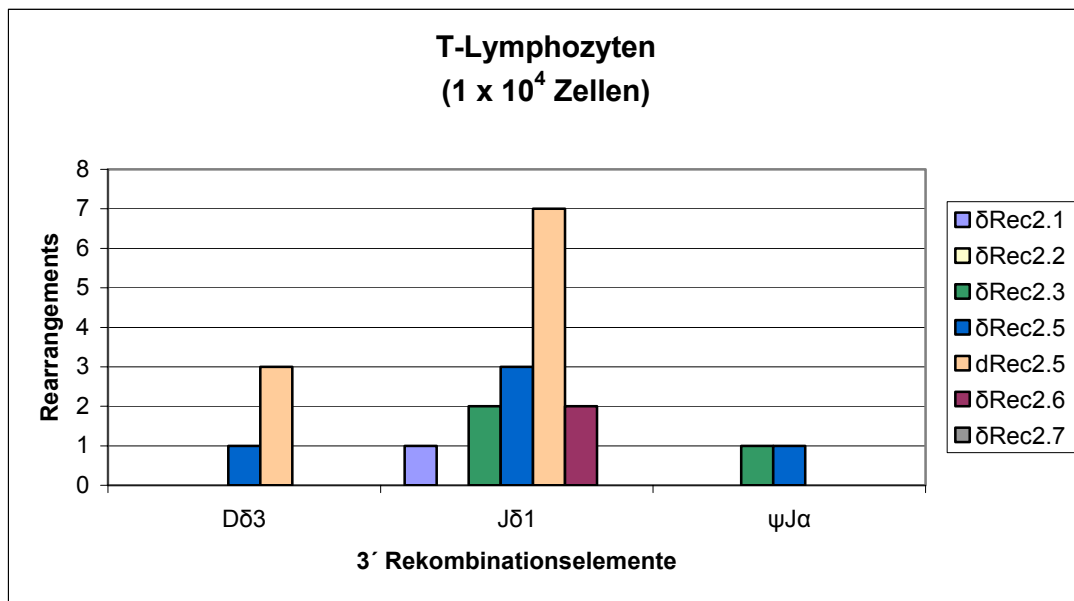


Abb. 13: T-Zellen: Übersicht der Anzahl der amplifizierten Rearrangements von δ Rec2.1-2.7 mit D δ 3, J δ 1 und ψ J α in 1 x 10⁴ Zellen.

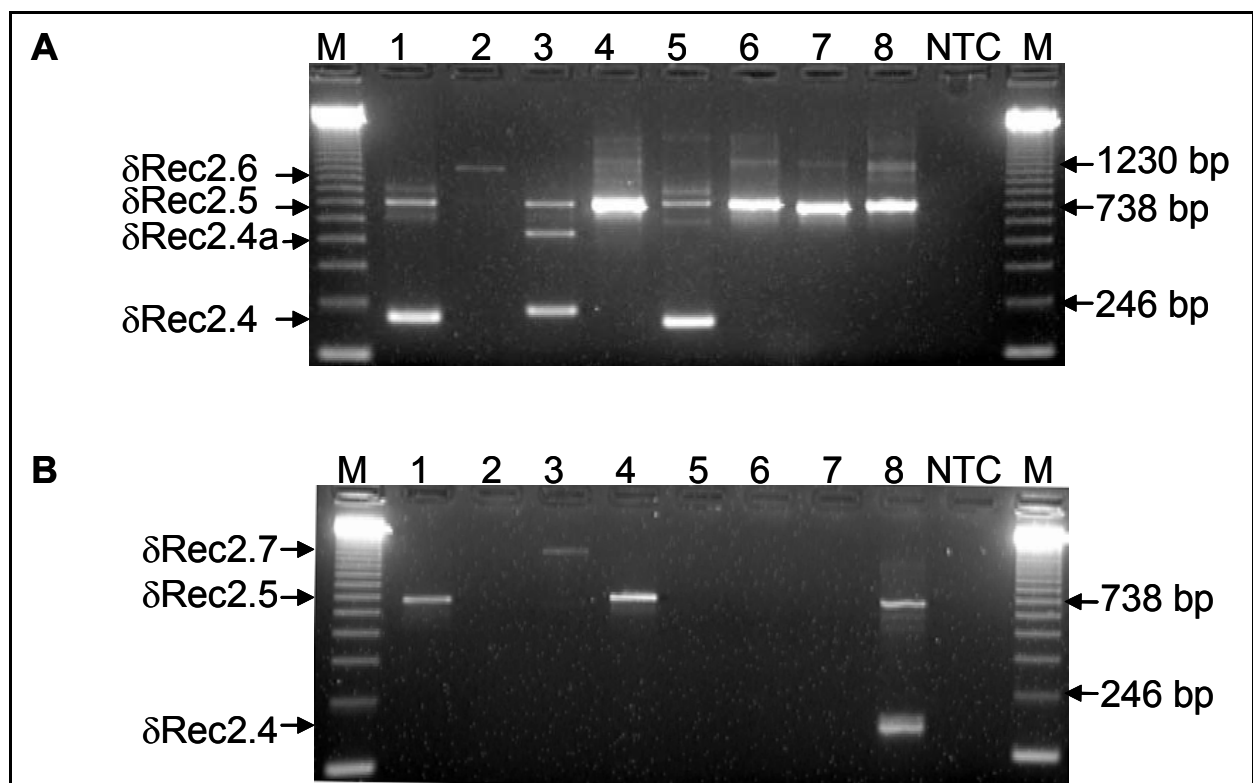


Abb. 14: PCR-Analysen von δ Rec2-Umlagerungen in T-Zellen A: δ Rec2-J δ 1 (1 x 10⁴ Zellen), B: δ Rec2-D δ 3 (1 x 10⁴ Zellen) M: 123 bp Molekulargewichts-Marker, 1-8: T-Zell-Proben, NTC: Negativkontrolle. Die nested-PCR wurde mit folgenden Primern durchgeführt: A: δ Rec2.4(-79) und J δ 1b(+102) B: δ Rec2.4(-79) und D δ 3(+77)

Interessanterweise konnten auch in B- und NK-Zellen δ Rec2-Rearrangements amplifiziert werden. Da beide Populationen hauptsächlich D δ 3-Umlagerungen zeigten (Abb. 15), konnte eine T-Zell-Kontamination weitestgehend ausgeschlossen werden. Bis auf eine Granulozyten-Probe waren B-, NK-Zellen und Granulozyten negativ für δ Rec2-J δ 1-Rearrangements. Diese eine positive, in Neutrophilen Granulozyten beobachtete, δ Rec2-J δ 1-Umlagerung könnte von einer geringfügigen T-Zell-Kontamination herrühren.

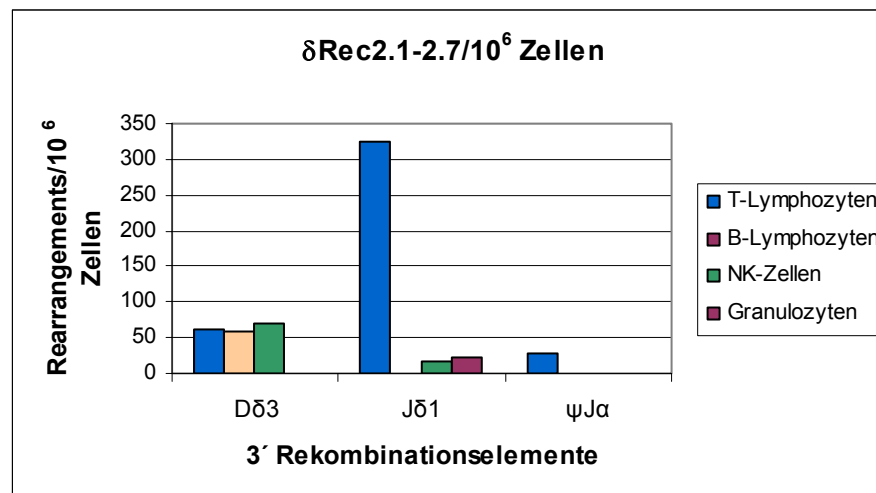


Abb. 15: Sortierte Zellpopulationen: Häufigkeit von δ Rec2-Umlagerungen in T-Lymphozyten, B-Lymphozyten und NK-Zellen sowie Neutrophilen Granulozyten

3.3 Untersuchung und Vergleich von Zellen in verschiedenen Entwicklungsstadien des TCRA/D-Rekombinationsprozesses

3.3.1 Rearrangements der δ Rec2.1-2.7-Elemente in Thymozyten

Bei Thymozyten gestaltete sich das Procedere ähnlich wie bei den sortierten Zellpopulationen. Die Frequenz der Rearrangements stieg insgesamt an. Auch waren, auf die einzelnen Proben bezogen, mehr, nicht dem Cluster δ Rec2.1-2.7 zuzuordnende Rearrangements zu beobachten (δ Rec2.3a-D δ 3, δ Rec2.3b-D δ 3, δ Rec2.4a-D δ 3, δ Rec2.5a-D δ 3). Diese „Exoten“ waren in sortierten bzw. unsortierten Leukozyten aus späteren Entwicklungsstadien nicht mehr zu finden. Interessanterweise waren Umlagerungen mit D δ 3 bei Thymozyten etwas häufiger, ($f = 615 \times 10^{-6}$) als jene Rekombinationen mit J δ 1 ($f = 464 \times 10^{-6}$). Dies steht ganz im Gegensatz zu den Ergebnissen bei T-Lymphozyten, wo Rekombinationen mit J δ 1 weitaus häufiger auftraten ($fJ\delta 1 = 326 \times 10^{-6}$, $fD\delta 3 = 55 \times 10^{-6}$). Rearrangements, in die $\psi J\alpha$ involviert war, waren äußerst selten zu finden. δ Rec2.4-D δ 3 und δ Rec2.5-J δ 1 waren, mit einer Umlagerungsfrequenz von jeweils 208×10^{-6} , die meistamplifizierten Rearrangements.

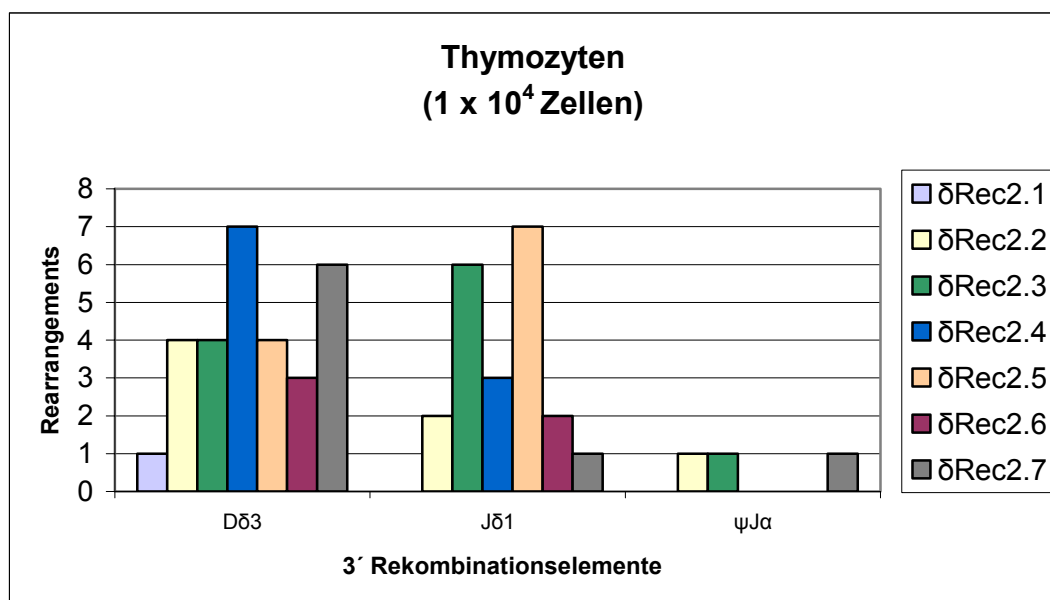


Abb. 16: Thymozyten: Übersicht der Anzahl der amplifizierten Rearrangements von δ Rec2.1-2.7 mit D δ 3, J δ 1 und $\psi J\alpha$ in 1×10^4 Zellen.

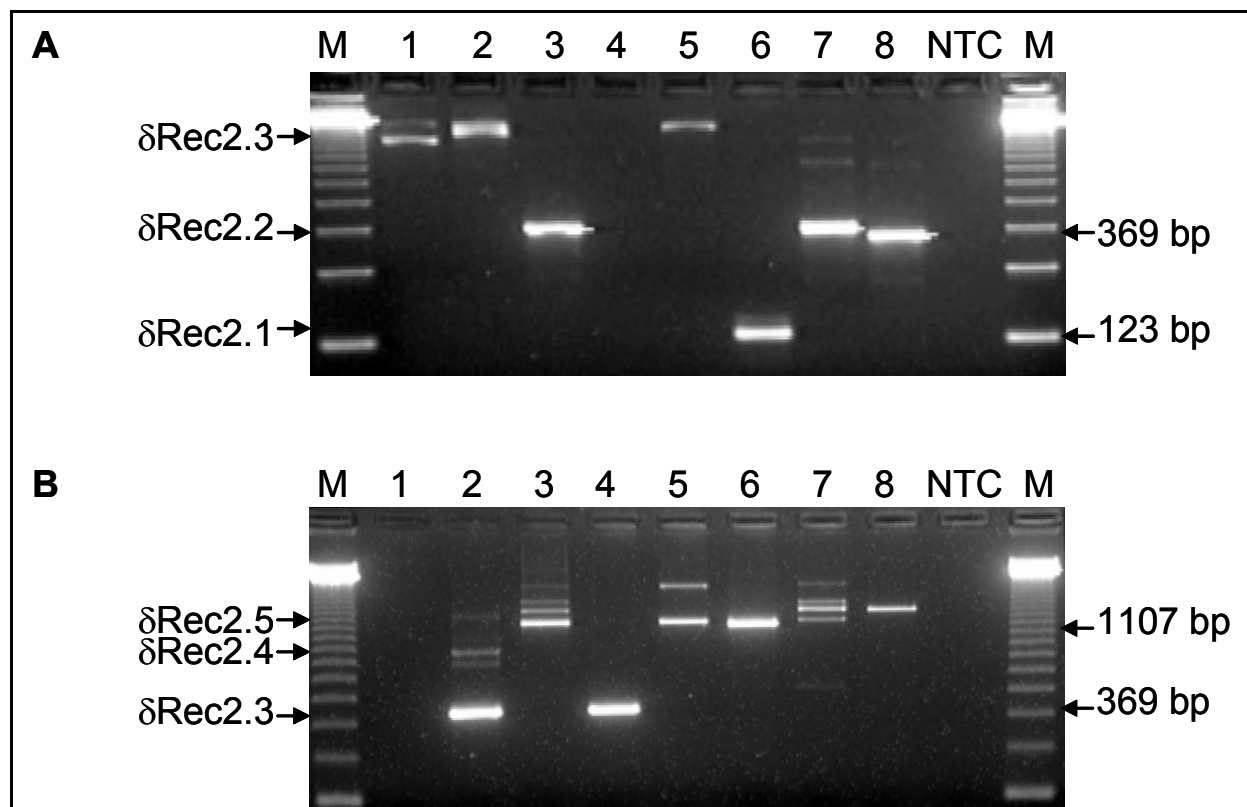


Abb. 17: PCR-Analysen von δ Rec2-D δ 3- und δ Rec2-J δ 1- Umlagerungen in Thymozyten A: δ Rec2-D δ 3 (1×10^4 Zellen), B: δ Rec2-J δ 1 (1×10^4 Zellen) M: 123 bp Molekulargewichts-Marker, 1-8: Thymozytenproben, NTC: Negativkontrolle. Die nested PCR wurde mit folgenden Primern durchgeführt: A: δ Rec2.1(-66) und D δ 3(+77) B: δ Rec2.3(-370) und J δ 1b(+102)

3.3.2 Vergleich von PBL, NK-Zellen, Neutrophilen Granulozyten, T- und B-Lymphozyten sowie Thymozyten

Um Aussagen über das zeitliche Auftreten der Umlagerungen von δ Rec2 mit den untersuchten Rekombinationselementen zu machen, war es sinnvoll, besonders T-Lymphozyten und Thymozyten zu vergleichen. Erwartungsgemäß war die Gesamtzahl der Rearrangements bei Thymozyten größer als bei T-Zellen. Bei Umlagerungen mit J δ 1 waren keine größeren Diskrepanzen zu vermerken. Weitaus interessanter war jedoch die Tatsache, dass Rekombinationen mit D δ 3 in Thymozyten ca. zehnfach häufiger als in T-Lymphozyten auftraten (Abb. 18). Um den reifungsspezifischen Unterschied zu dokumentieren, wurden die Thymozyten nochmals in fetale und postnatale aufgegliedert.

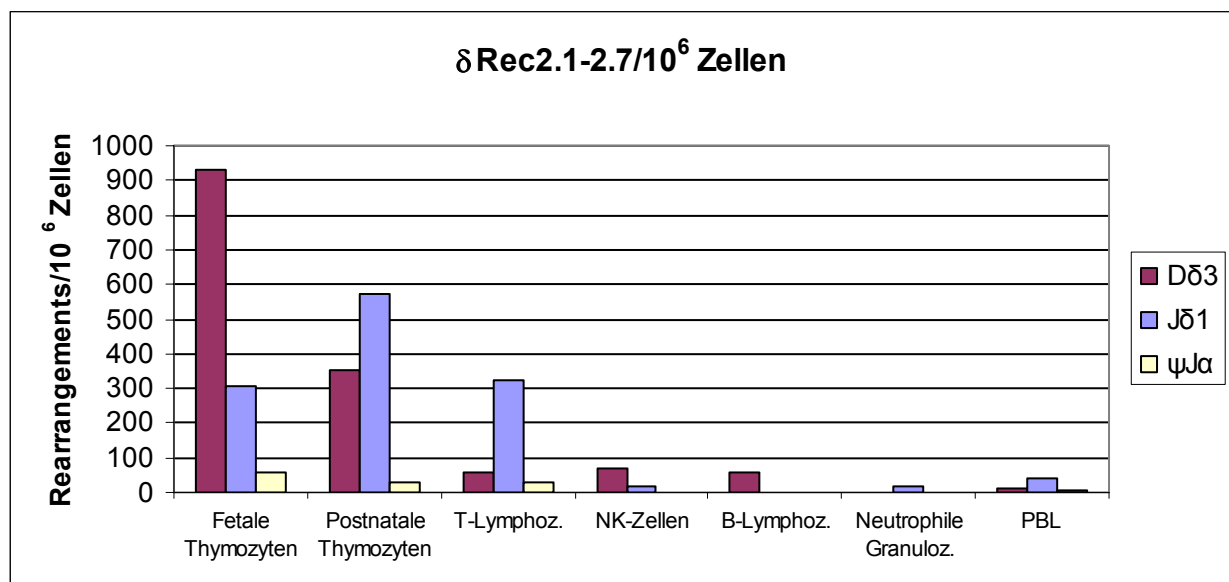
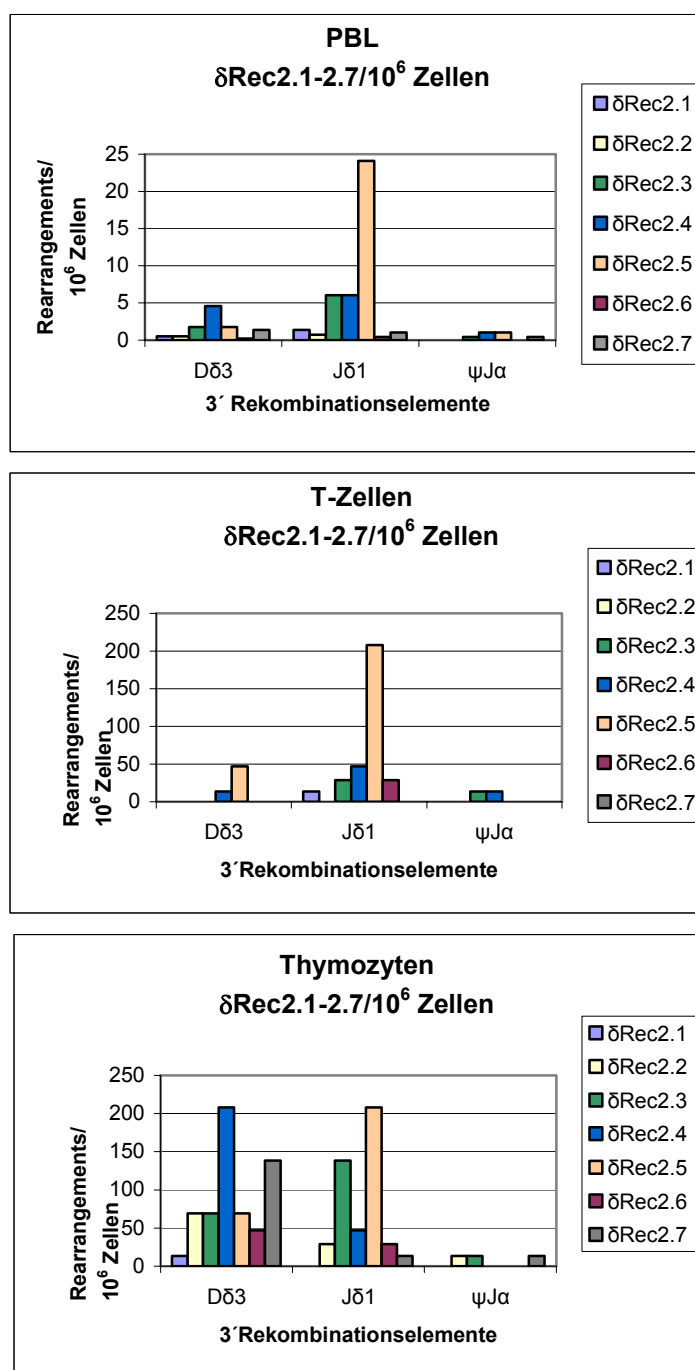


Abb. 18: Häufigkeit von δ Rec2.1-2.7-Rearrangements in Thymozyten, reifen T-Lymphozyten, NK-Zellen, B-Lymphozyten, Neutrophilen Granulozyten und peripheren Leukozyten nach Rekombinationspartnern aufgegliedert

Abb. 19: Häufigkeit von $\delta\text{Rec}2.1-2.7$ -Rearrangements in Thymozyten, T-Zellen und Leukozyten

Um zu klären, ob die beobachteten Differenzen statistisch signifikant waren, wurde der Fisher-Exakt-Test eingesetzt, der für kleine Probenkollektive Mittel der Wahl ist, um eventuelle statistische Signifikanz zu ermitteln. Hierzu wurden die Werte für das Auftreten von D δ 3-Rearrangements bei Thymozyten bzw. T-Lymphozyten ins Verhältnis zur Häufigkeit von J δ 1-Umlagerungen bei denselben Zellpopulationen gesetzt.

a = 29	b = 21	r ₁ = 50
c = 4	d = 15	r ₂ = 19
c ₁ = 33	c ₂ = 36	n = 69

Formel:
$$p = \frac{(r_1!r_2!c_1!c_2!)}{n!a!b!c!d!}$$

a = D δ 3-Rearrangements bei Thymozyten

b = J δ 1-Rearrangements bei Thymozyten

c = D δ 3-Rearrangements bei T-Zellen

d = J δ 1-Rearrangements bei T-Zellen

p = 0,006 (p < 0,05 = signifikanter Unterschied)

Da das Signifikanzniveau unter 5%, d.h. p < 0,05 liegt, kann die Nullhypothese verworfen werden. Somit ist die Differenz des Merkmals D δ 3 zwischen den beiden Zellpopulationen signifikant, bzw. nicht als zufällig anzusehen.

Weiterhin, waren die Umlagerungen δ Rec2.4-D δ 3 und δ Rec2.7-D δ 3, welche in der Mehrzahl der Thymozytenproben beobachtet worden waren (7/8 bzw. 6/8), in T-Zellen scheinbar nicht vorhanden (1/8 bzw. 0/8, p = 0,00).

3.4 Sequenzen

3.4.1 Analyse der RSS

Analysen der Keimbahnsequenz strangabwärts vom Umlagerungsbruchpunkt ließen palindromische Heptamer-Sequenzen mit einer durchschnittlichen Homologie von 75% zur Consensus-Sequenz (CACAGTG) erkennen. Normalerweise bestehen Rekombinations-Signal-Sequenzen aus einem Heptamer, einem Spacer und einem Nonamer. Das Heptamer ist in der Regel stark konserviert, wobei die ersten drei Basenpaare der palindromischen Sequenz (siehe Tabelle 16 und Ramsden et al. 1994) annähernd in einhundert Prozent der RSS gleich sind. Der Spacer hingegen, hier ein 23 bp Spacer ($\pm 1-2$ bp), ist überwiegend durch seine Länge bestimmt. Nur bei wenigen Basenpaarpositionen wurde in vorangegangenen Arbeiten eine größere Homologie festgestellt. Die Nonamere sind bei funktionellen Umlagerungen äußerst homolog und fallen insbesondere durch adeninreiche Sequenzen auf.

Bei Betrachtung der nichtfunktionellen Umlagerungen mit δ Rec2.1-2.7 war auffällig, dass die Spacer so gut wie keine Sequenzhomologien zur Consensus-Matrize aufwiesen. Die Homologie der einzelnen Nukleotid-Positionen lag bei maximal 57%. Auch die Nonamere waren als nicht oder nur gering konserviert anzusehen. Nur zwei von sieben δ Rec2-Elementen (δ Rec2.3 und δ Rec2.4) besaßen ein sinnvolles Nonamer mit 67% bzw. 56% Homologie zur Consensus-Sequenz (ACAAAAACC). Die Heptamere hingegen zeigten bessere Übereinstimmungen, wobei auffiel, dass alle Sequenzen das CAC-Motiv der palindromischen Consensus-Sequenz trugen. Die Positionen sechs und sieben waren mit je 71% Übereinstimmung noch relativ gut konserviert. Augenfällig war auch die Tatsache, dass, je besser die Heptamere mit der Consensus-Sequenz übereinstimmten, Umlagerungen mit den entsprechenden Elementen umso häufiger zu beobachten waren. Beispielsweise besaß das Heptamer von δ Rec2.5 eine hundertprozentige Übereinstimmung mit der Consensus-Sequenz und stellte damit gleichzeitig das Rekombinationselement mit der höchsten Umlagerungsfrequenz dar.

Tabelle 16: Sequenzen von δ Rec2.1-2.7: Sequenzhomologie der δ Rec2.1-2.7-Elemente im Vergleich zur Consensus-Sequenz und δ Rec
 _ : identisch mit Consensus-Sequenz (wenn Consensusbase mindestens zu 50% konserviert)
 Die Daten beziehen sich auf RSS-Auswertungen von Ramsden et al. 1994.

	Heptamer	Spacer	Nonamer
Consensus	<u>CACAGTG</u> --- --- --- --- --- --- --- --		<u>ACAAAAACC</u>
δRec	<u>CACGGTG</u> atg cat agg cac ctg cac ccc gt		<u>GCCTAAACC</u>
δRec2.1	<u>CACAGCA</u> tgt aat ttg ggg aga tgg ggg ac		<u>CCATAGAGA</u>
δRec2.2	<u>CACACTG</u> tct tct aaa atc atc tgc atc tct		<u>TCATCTGTG</u>
δRec2.3	<u>CACCATG</u> aga aac atg aga gac tgg ccc		<u>ACATATTCC</u>
δRec2.4	<u>CACCGTG</u> taa aga ata gaa att aat ttc ta		<u>ACTAAATGT</u>
δRec2.5	<u>CACAGTG</u> gtg cac aag gct ggt gcg gac tct		<u>GCCTTCTGA</u>
δRec2.6	<u>CACGATA</u> aca cag ttt cct aaa caa agg gg		<u>GCGATTCTT</u>
δRec2.7	<u>CACCCAG</u> cat gct cga ctt gat aga aaa a		<u>AGACCCAGT</u>

A:

Position	1	2	3	4	5	6	7
Consensus	C	A	C	A	G	T	G
%G	0	0	0	14	43	0	71
%A	0	100	0	43	29	14	29
%T	0	0	0	0	0	71	0
%C	100	0	100	43	29	14	0

B:

Position	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
Consensus	G/A/T/C	T/G/C	G/A/C	C/G/T	A/G	A/G/T/C	A/G/C/T	C/G/T/A	C/T/A	A/C/G/T	A/C/T/G
%G	14	29	14	14	14	14	0	14	43	43	29
%A	29	29	43	43	57	14	57	29	43	29	14
%T	43	14	43	14	0	43	29	57	14	0	29
%C	14	29	0	29	29	29	14	0	0	29	29

Position	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24
Consensus	G/A/T/C	T/G/A/C	G/C	T/G/C/A	G/T	A/G/C/T	A/G/T/C	G/C	C/T	C/G	A/T	.	
%G	14	43	29	0	14	57	43	29	29	29	14	0	0
%A	29	57	43	29	29	29	29	43	29	14	29	14	0
%T	43	0	29	43	43	0	14	14	29	0	43	0	29
%C	14	0	0	29	14	14	14	14	14	57	0	43	0
%0											14	43	71

C:

Position	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Consensus	A	C	A	A/G/C	A	A	A	C	C
%G	29	14	14	0	0	14	14	57	14
%A	43	0	57	29	43	14	29	0	29
%T	14	0	14	57	29	43	43	14	43
%C	14	86	14	14	29	29	14	29	14

Abb. 20: Nukleotidhäufigkeiten für δ Rec2.1-2.7:

A: Consensus- und Nukleotidhäufigkeiten für δ Rec2.1-2.7-Heptamere

B: Consensus- und Nukleotidhäufigkeiten für δ Rec2.1-2.7-Spacer

C: Consensus- und Nukleotidhäufigkeiten für δ Rec2.1-2.7-Nonamere

Die Consensussequenz wurde mittels der „Mehrheits-Regel“ festgelegt und basiert auf Arbeiten von Ramsden et al. 1994 und McMorris et al. 1992. Die Nukleotide sind, wenn mehrere für eine Position angegeben wurden, vom häufigsten zum seltensten geordnet.

3.4.2 Analyse der sequenzierten Rearrangements bzw. Verbindungsregionen/Verwendung des D δ 3-Elementes

δ Rec2-D δ 3 (Abbildung 21):

Alle sequenzierten Umlagerungen mit D δ 3 zeigten kein weiteres Rekombinationselement, wie z.B. D δ 2. Interessant war die Tatsache, dass vier D δ 3-Umlagerungen überhaupt kein D δ 3-Element bzw. nicht dessen codierende Sequenz enthielten, sondern wahrscheinlich mit der 3' vom Exon gelegenen RSS von D δ 3 rearrangierten. Dies stellt einen Bruch der 12/23-er Regel dar, da es sich bei den RSS δ Rec2.1-2.7 auch um 23-RSS handelt. Neben den oft amplifizierten Umlagerungen wurden auch einige sehr seltene sequenziert, die aber nicht in die Häufigkeitsberechnungen der Rearrangements des Clusters mit eingingen. Dies sind δ Rec2.3a-D δ 3, δ Rec2.3b-D δ 3, δ Rec2.4a-D δ 3 und δ Rec2.5a-D δ 3.

δ Rec2-J δ 1 (Abbildung 22):

δ Rec2-J δ 1-Umlagerungen enthielten D δ 3- und in einigen Fällen D δ 1- und D δ 2-Genelemente. Die Sequenzanalysen zeigten desweiteren, dass, bis auf eine Ausnahme, alle δ Rec2-J δ 1-Rearrangements D δ 3 Elemente enthielten. Somit ähneln sie sehr konventionellen V δ -J δ -Umlagerungen. Auffällig waren relativ viele N-Nucleotidinsertionen an den Verbindungsstellen der *coding joints*. Von den selteneren RSS wurde nur δ Rec2.4a in Verbindung mit D δ 3 und J δ 1 amplifiziert.

δ Rec2- ψ J α (Abbildung 23):

Rearrangements zwischen δ Rec2 und ψ J α enthielten, im Gegensatz zu Verknüpfungen mit J δ 1, nur in einem Fall ein D δ 3-Element und waren sonst direkt verbunden. Dies ähnelt eher Umlagerungen vom V α -J α -Typ ($p=0,001$).

δ Rec2-D δ 3	N/D δ 1	D δ 2	N	D δ 3
	<u>GAAATAGT</u>	<u>CCTTCCTAC</u>		<u>ACTGGGGATACGCACAGTGCTA</u>
δ Rec2.1 (179598) Th. Nr.6	CACCAGAGGA CACCA	AT		-----CACAGTGCTA
δ Rec2.2 (179816) Th. Nr.8	ACACAAGCTTT ACACAAGCTT	TCA		-----TA
δ Rec2.3 (180557) Th. Nr.7	TCCCAGGGTA TCCCAGGGTA	AT		<u>TGGGGGATACGCACAGTGCTA</u>
δ Rec2.3a (180790) Th. Nr.2	GTGACTTTTAC GTGACT	CC		<u>CTGGGGGATACGCACAGTGCTA</u>
δ Rec2.3b (180942) Th. Nr.7	ACGGGTACCAGAAAA ACG	TGGG		-----TA
δ Rec2.4 (180969) NK Nr.3	GTGCAGGAGC GTGCAGGAGC	GT		<u>CTGGGGGATACGCACAGTGCTA</u>
δ Rec2.4a (181263) Th. Nr.7	CAGCATTAT CAGCATTTA			<u>GATACGCACAGTGCTA</u>
δ Rec2.5 (181501) PBL Nr.2	ATGCCAGGGA ATGCCAGG	A		-----AGTGCTA
δ Rec2.5a (181567) Th. Nr.5 PBL Nr.1	CTCATCTACC CTC CTCATCTA	TGG TAG		<u>TGGGGGATACGCACAGTGCTA</u> <u>GGGGGATACGCACAGTGCTA</u>
δ Rec2.6 (181886) Th. Nr.1	CACAATGAAAAGC CACAA	AATTA		<u>ACTGGGGGATACGCACAGTGCTA</u>
δ Rec2.7 (182157) Th. Nr.3	AGTGGAACAGTGTC AGTGG	GG		<u>ACTGGGGGATACGCACAGTGCTA</u>

Abb. 21: Sequenzen der Verbindungsregionen der Rearrangements zwischen δ Rec2.1-2.7 und D δ 3. N: Nukleotide die durch die TdT eingefügt wurden. Die D δ 3-Gensegmente sind unterstrichen. Die Zahlen in Klammern geben die Position der RSS auf Chromosom 14q11 an (GeneBank-Zugriffsnummer: HUA0000661).

$\delta\text{Rec2-(D}\delta 1\text{)-(D}\delta 2\text{)-(D}\delta 3\text{)-J}\delta 1$	N/D $\delta 1$	D $\delta 2$	N	D $\delta 3$	N
$\delta\text{Rec2.1 (179598)}$ T-Nr.4	<u>GAATAGT</u> TCCGG	<u>CCTTCCTAC</u> TAC CCCC GG T		<u>ACTGGGGATACGCACAGTGCTA</u> CTGA	
$\delta\text{Rec2.2 (179816)}$ Th. Nr.4	CATG			<u>TGGG</u> AAACGGCCCT	
$\delta\text{Rec2.3 (180557)}$ Th. Nr.6	GGCNCNC			<u>CTGGGG</u> CN	
$\delta\text{Rec2.4 (180969)}$ PBL Nr.8	TT			<u>ACTGGGG</u> CGATNTCG	
$\delta\text{Rec2.4a (181263)}$ T-Nr.3	CTAGCGTTGGTT	TTC AGTAACCCGAC		<u>GGGGGATACG</u> CTATACC	
$\delta\text{Rec2.5 (181501)}$ PBL Nr.1	TCCTGG			<u>ACTGGGGGA</u> AAATTGCTTGC	
NK-Nr.4 (181467)	TTCCG	<u>CCTTCCTAC</u> GACGG		<u>TGGG</u> TACT	
$\delta\text{Rec2.6 (181886)}$ T-Nr.4	CTGTGGTAGT	GCTCGCTG		<u>GGGGGAT</u> AAT	
Th. Nr.2	T	<u>CTTCC CCTCCCCG</u>		<u>ACTGGGGGATACG</u> AACTTGAAGATGGGGGGATAT	
Th. Nr.2	CCCTGGCCTCG	<u>CTTCC AGT</u>		<u>ACTGGG</u> CTT	
G-Nr.3 (181845)	<u>TAGT</u>			<u>ACTGGGGGATAC</u> CTT	
$\delta\text{Rec2.7 (182157)}$ Th. Nr.3	AGGAAGTC				

Abb. 22: Sequenzen der Verbindungsregionen der Rearrangements zwischen $\delta\text{Rec2.1-2.7}$ und D $\delta 2$, D $\delta 3$ und J $\delta 1$. N: Nukleotide, die durch die TdT eingefügt wurden. Die D $\delta 2$ -, D $\delta 3$ - und J $\delta 1$ -Gensegmente sind unterstrichen. Die Zahlen in Klammern geben die Position der RSS auf Chromosom 14q11 an (GeneBank-Zugriffsnummer: HUAEE000661).

$\delta\text{Rec2}-(\text{D83})-\psi\text{Ja}$	N/D81	D82	N	D83	N	ψJa
$\delta\text{Rec2.2}$ (179816) Th. Nr.7	<u>ACACAAGCTT</u> ACACAAGCTT	<u>GAAATAGT</u> T		<u>ACTGGGGGATACGCACAGTGCTA</u> ACTGGGGG		<u>GGTACCGGGTTA</u> GGTACCGGGTTA
$\delta\text{Rec2.3}$ (180557) PBL Nr.6	<u>TCCCAGGGTA</u> TCCCAGGG		CACC			<u>GGTACCGGGTTA</u>
$\delta\text{Rec2.4}$ (180969) PBL Nr.10	<u>GTGCAGGAGC</u> GTGCAGG		TCCTT			<u>TACCGGGTTA</u>
$\delta\text{Rec2.5}$ (181501) PBL Nr.1 PBL Nr.2 PBL Nr.7 PBL Nr.8	<u>ATGCCAGGGA</u> ATGCCAGGGA ATGCCAGGGA ATGCCAGGGA ATGCCAGG		G TA TAG ATA			<u>CGGGTTA</u> <u>GGGTTA</u> <u>CCGGGTTA</u> <u>GGTTA</u>
$\delta\text{Rec2.7}$ (182157) Th. Nr.3	<u>AACAGTGTGC</u> AACAGT		TGG			<u>GGTACCGGGTTA</u>

Abb. 23: Sequenzen der Verbindungsregionen der Rearrangements zwischen $\delta\text{Rec2.1-2.7}$ und D83 und ψJa . N: Nukleotide, die durch die TdT eingefügt wurden. Die D83- und ψJa -Gensegmente sind unterstrichen. Die Zahlen in Klammern geben die Position der RSS auf Chromosom 14q11 an (GeneBank-Zugriffsnummer: HUAE000661).

3.4.3 Homologievergleich der humanen δ Rec2-Sequenzen mit ihren Pendants bei Mäusen

Da in einzelnen Arbeiten Homologien zwischen *TCRD*-Deletionselementen bei Mäusen und beim Menschen von bis zu 80% festgestellt wurden, war es interessant, ob ähnliches auch für δ Rec2.1-2.7 zutraf. Dies war jedoch weder beim humanen δ Rec noch bei seinen drei murinen Pendants der Fall. Auch der direkte Sequenzvergleich wies nur geringe Homologien auf, insbesondere an den umlagerungssensitiven Bereichen der RSS, den Heptameren und Nonameren (siehe Tabelle 21). Der Vergleich der Nukleotid-Sequenz des humanen δ Rec2.1-2.7-Genclusters mit der analogen Region des murinen *TCRD*-Gens zeigte eine Gesamthomologie der Sequenz von 55%. Die höchste Übereinstimmung wurde innerhalb einer 102 bp großen Region (HUA000661, 180744-180845), 143 bp 5' vom δ Rec2.4-Heptamer (77%) entfernt und einer 313 bp großen Region (HUA000661, 180121-180433), 122 bp 5' von δ Rec2.3 entfernten Region (70%), gefunden.

δRec2.1 179581 H CACAGCATG--TAATTTGGGGAGATGGGGGACCCATAGAGA 179619
 ||| ||| | | ||||| | | ||| |
 6951 M AACA-TATGGTTTACTTGGGGATCAGTCACGCCTAACCTGT 6990

Homologie: 51%

δRec2.2 179816 H CACACTGTCTTCTAAAAATCATCTGCATCTCTTCATCTGTG 179855
 ||| | | | ||| | ||| ||| | |
 7172 M TACA-ACTGTGGATAGCACA-CAGTTTCTCCTCACCATT 7209

Homologie: 48%

δRec2.3 180557 H CACCATGAGAAACATGAGAGACTGGCC-CACATA-TTCC 180599
 | | ||| ||| ||| |||
 7888 M TGTCTTACTGGAC-TCTCT---TGGAGTCACCTCTTTC- 7927

Homologie: 38%

δRec2.4 180968 H CACCGTGTAAAAGAATAGAAATTA-ATTTCTAACTAAATGT 181006
 | ||| ||||| ||||| || ||||| || | |
 8257 M --CTGTGCAAAGAAGAGAAA-TAGATTTCTGACCAGTTCT 8293

Homologie: 72%

δRec2.5 181501 H CACAGTGGT-GCACAAGGCTGG--TGCGGACTCTG-CCTTC-TGA 181540
 | ||| ||||| ||| | || ||| ||| |||
 8656 M GATGCTGGGGGCACAAGGTTGGCATTCTG--CTTTGTCC--CGTGA 8696

Homologie: 70%

δRec2.6 181886 H CACG-ATAACACAGTTTCCTAAACAAAGGGGCGATTCTCT 181923
 | ||| | | ||||| ||||| | | ||| |
 9040 M -ATGTATATCTCATTTTCCTAAACAAAAGACC-ATTC-T 9075

Homologie: 72%

δRec2.7 182157 H CACCCAGCATGCTCGACTTGATAGAAAAAGACCCAGT 182195
 | ||||| | | || ||| ||| ||| |||
 9291 M -AAGTAGCATGCAAAAAAT-ATGGAAAG--GACACA-T 9323

Homologie: 58%

Abb. 24: Sequenzvergleiche der δRec2-Region von Mensch und Maus (H = Homo sapiens sapiens, GeneBank-Zugriffsnummer: HUAE000661, M = Mus musculus, GeneBank-Zugriffsnummer: AF019412 sowie Nukleotidpositionen)

3.4.4 T-Zelllinie DND41

DND41, eine von einer T-ALL stammende Zelllinie, enthält ein funktionelles V δ 1-J δ 1-Rearrangement, dessen Produkt sich mit der TCR β -Kette zusammenlagert und ein anormales TCR $\beta\delta$ -Heterodimer bildet (Hochstenbach et al. 1989). Zusätzlich besitzt die DND41-Zelllinie ein bisher unbekanntes Rearrangement mit J δ 1 auf dem zweiten Allel. Basierend auf Southern-Blot-Analysen, mit für J δ 1 bzw. V δ 2 spezifischen Sonden, war zu vermuten, dass ein Element des δ Rec2-Clusters, in Umlagerung mit J δ 1, in der DND41-T-Zell-Linie involviert ist (Breit et al. 1997). In einer 35 Zyklen langen PCR, mit δ Rec2.5(-483)- und J δ 1a(+155)-Primern konnte ein 700 bp langes Produkt amplifiziert werden. Die direkte Sequenzanalyse des PCR-Produktes bewies das Vorhandensein eines δ Rec2.5-(D δ 3)-J δ 1-Rearrangements, welches auch die häufigste δ Rec2-Umlagerung in PB-T-Lymphozyten war.

Tabelle 17: Sequenz des δ Rec2.5-(D δ 1)-(D δ 3)-J δ 1-Rearrangements der Zelllinie DND41. N: Nukleotide, die durch die TdT eingefügt wurden.

δ Rec2.5	N	D δ 1	N	D δ 3	N	J δ 1
ATGCCA	TGGGCGAC	AAATA	TATAC	GGGGGATACG	GGAGAAA	GATAAACT

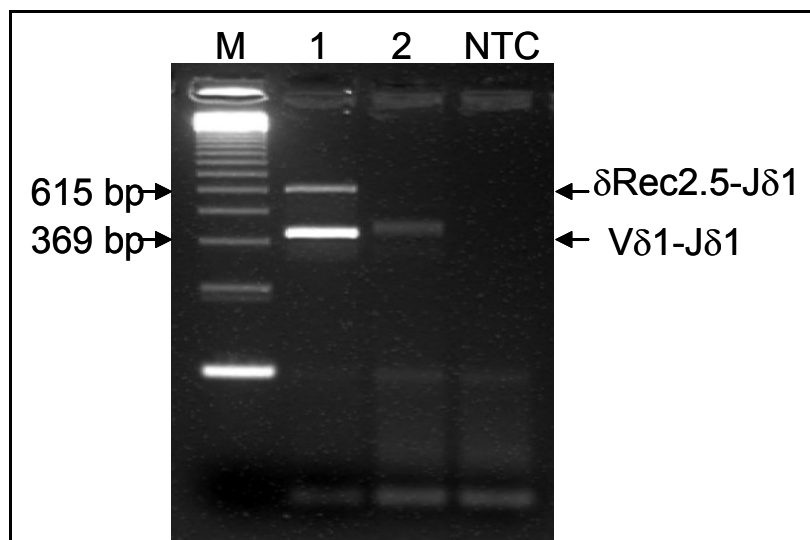


Abb. 25: DND41: Rearrangements der beiden Allele M: 123 bp Molekulargewichts-Marker, 1: DND41, δ Rec2.5-(D δ 1)-(D δ 3)-J δ 1, V δ 1-J δ 1 2. Gesunder Spender, V δ 1-J δ 1, NTC: Negativkontrolle. Die PCR wurde mit folgenden Primern durchgeführt: 5': δ Rec2.5(-483) und V δ 1, 3': J δ 1b(+102) mit 40 Zyklen und den in Tabelle 11 beschriebenen Bedingungen.

4 Diskussion

4.1 Zusammenhang zwischen Umlagerungsfrequenz und Zelltyp bzw. –entwicklungsstadium

Der T-Zell-Rezeptor δ ist, sowohl aufgrund seiner Schlüsselposition als Deletionselement zum reifen α/δ -T-Lymphozyten, als auch als Marker zur Rearrangement-Diagnostik bei MRD, ein gut charakterisierter Genomabschnitt. Es wurde ein Cluster, bestehend aus sechs neuen und einem kürzlich beschriebenen Rekombinationselement (Przybylski et al. 2001) gefunden, welcher 2,6-5,2 kb strangabwärts des V δ 2-Gensegmentes lokalisiert ist. Diese δ Rec2-Elemente werden, wie das schon länger bekannte δ Rec, unabhängig von codierenden Sequenzen vom RAG1/RAG2-Proteinkomplex erkannt und mit codierenden Genelementen umgelagert.

Den δ Rec2.1-2.7-Cluster einbeziehende Rearrangements wurden im peripheren Blut aller gesunden Individuen mit einer Frequenz von $0,4 \times 10^{-3}$ gefunden. Dies sind hundertmal weniger als klassische δ Rec-Rearrangements mit 2-5% in PBL (Verschuren et al. 1997). Aus diesem Grunde ist anzunehmen, dass δ Rec2- ψ J α -Umlagerungen bei weitem nicht die Bedeutung eines δ Rec- ψ J α -Rearrangements bei der Deletion des *TCRD* haben.

Die Häufigkeit der Umlagerungen mit Elementen des δ Rec2-Clusters differierte zwischen den verschiedenen untersuchten Zellpopulationen. So war sie am höchsten in Thymozyten, da die Rekombinationsmaschinerie bei sich noch in der Entwicklung befindlichen T-Zellen in vollem Gange ist. In Leukozyten aus peripherem Blut waren erwartungsgemäß die wenigsten Umlagerungen zu finden, da der überwiegende Teil der Leukozyten aus Granulozyten besteht, in denen keine V(D)J-Rekombination stattfindet.

Um nähere Einblicke in die Abfolge der T-Zell Differenzierung zu bekommen, wurde die Frequenz von δ Rec2.1-2.7-Rearrangements in Thymozyten und reifen PB-T-Lymphozyten verglichen. Das Verhältnis von δ Rec2-D δ 3- zu δ Rec2-J δ 1-Rearrangements sank von 2,6 in fetalen Thymozyten über 0,6 in postnatalen Thymozyten hin zu 0,27 in T-Lymphozyten.

An J δ 1-Umlagerungen waren δ Rec2-D δ 2-D δ 3-J δ 1, δ Rec2-D δ 3-J δ 1, δ Rec2-D δ 1-D δ 3-J δ 1 und nur einmal δ Rec2-J δ 1 zu finden. Es fanden sich demzufolge, wie zu erwarten war, fast immer D δ 3-Segmente in der Verknüpfungsregion. Dies ist ein Hinweis dafür, dass diese Rearrangements, ausgehend von der anfänglichen Rekombination mit D δ 3, während der T-Zell-

Differenzierung weiter in Richtung 5' bzw. 3'(J δ 1) umgelagert werden. Ob nun wirklich im Verlauf der T-Zell-Rezeptor-Ontogenese weiter 5'gelegene RSS des Clusters verwendet werden, konnte aufgrund der geringen Probenzahl nicht genau geklärt werden. Im Gegensatz dazu, enthielt die Mehrheit der δ Rec2- ψ J α -Umlagerungen kein D δ 3-Segment, was nahe legt, dass es sich hierbei um direkte Rearrangements handelt (siehe Tabelle 20).

Interessanterweise waren δ Rec2-Rearrangements nicht T-Zell-spezifisch. In den untersuchten Proben waren sowohl bei B- als auch NK-Zellen δ Rec2-D δ 3-, jedoch fast keine δ Rec2-J δ 1-Rearrangements zu detektieren. Auch frühere Arbeiten über Rearrangements bei ALL zeigen, dass es fast nur in T-Lymphozyten zu kompletten V(D)J-Rearrangements kommt (Loiseau et al. 1989, Seeger et al. 2001). In Precursor-B-ALL sind meist nur unvollständige Umlagerungen des *TCRD*, wie V δ 2-D δ 3 oder D δ 2-D δ 3, beschrieben (Biondi et al. 1990, Steenbergen et al. 1995). Auch Untersuchungen von Breit et al. 1993, der sechs häufige Umlagerungen bei CD3+-, TCR γ δ + oder TCR $\alpha\beta$ + T-ALL und Precursor-B-ALL analysierte, belegen dies (siehe Tabelle 23). Man erkennt in dieser Tabelle leicht, dass keine einzige Precursor-B-ALL J δ 1 Umlagerungen enthält, genauso wie keine *TCRAB*+ T-ALL noch D δ 3-Rearrangements besitzt. Leider existieren keine Daten von gesunden Individuen, da diese natürlich mit dem in dieser Arbeit getesteten Probenkollektiv noch besser vergleichbar wären.

Tabelle 18: Relative Allel-Häufigkeit von sechs bevorzugten *TCRD*-Gen-Rearrangements in verschiedenen ALL-Untergruppen. Angaben in Prozent. Die Anzahl der rearrangierten Allele steht in Klammern. (Quelle: Breit et al. 1993)

	T-ALL			
<i>TCRD</i> -Rearrangement	CD3- (90)	<i>TCRGD</i> + (48)	<i>TCRAB</i> + (15)	Precursor-B-ALL (60)
V δ 1-J δ 1	24,4 (22)	56,3 (27)	13,3 (2)	0 (0)
V δ 2-J δ 1	10,0 (9)	6,3 (3)	20,0 (3)	0 (0)
V δ 3-J δ 1	5,6 (5)	8,3 (4)	6,7 (1)	0 (0)
D δ 2-J δ 1	10,0 (9)	14,6 (7)	6,7 (1)	0 (0)
V δ 2-D δ 3	5,6 (5)	4,2 (2)	0 (0)	71,7 (43)
D δ 2-D δ 3	4,4 (4)	0 (0)	0 (0)	10,0 (6)
Andere	40,0 (36)	10,4 (5)	53,3 (8)	18,3 (11)

In *in-vitro*-Experimenten wurde gezeigt, dass D δ 3-Umlagerungen nicht so streng reguliert werden wie J δ 1-Rearrangements und keiner Aktivierung eines *TCRD*-Enhancers bedürfen (Lauzurica et al. 1994). Sie können sogar in nicht-lymphatischen Zellen, mittels Einbringung lymphatischer Transkriptionsfaktoren, induziert werden. Daher könnte es sein, dass die hier beschriebenen δ Rec2-D δ 3-Umlagerungen auch in frühen lymphatischen Progenitor-Zellen vorkommen, die noch keiner Zelllinie zuzuordnen sind. Danach könnten δ Rec2-D δ 3-Rearrangements nur dann zu δ Rec2-J δ 1-Rearrangements umgelagert werden, wenn die Zellen sich weiter zu T-Zellen differenzieren und T-Zell-spezifische *TCRD*-Enhancer aktiviert werden.

4.2 Bedeutung der Lage von Umlagerungselementen bzw. deren Funktion bei der Deletion von *TCRD*

Durch Rearrangements mit den gefundenen δ Rec2-Cluster-Elementen kann keine V δ -Region mit der vorhandenen δ Rec2-(D δ)-J δ -Umlagerung verknüpft werden. Um ein solches nichtfunktionelles Rearrangement zu deletieren, kommt am ehesten die 5' von V δ 2 isoliert liegende RSS δ Rec in Betracht (de Villartay et al. 1988, Hocket et al. 1988, Hara et al. 1991). Wie in der Einleitung beschrieben, führt die Rekombination von δ Rec und ψ J α zur Deletion von D δ - und J δ -Elementen und ist damit einleitender Schritt auf dem Weg zum α/β -T-Lymphozyten (de Villartay et al. 1988, Hocket et al. 1988). In weiterführenden Studien wurden in CD3+-T-Zell-Vorläufern und Thymozyten auch δ Rec-(D δ)-J δ 1-Umlagerungen gefunden (Hara et al. 1991, Verschuren et al. 1997). Aus anderen Arbeiten geht hervor, dass 3' von δ Rec gelegene Umlagerungselemente durch ihre räumliche Nähe eher mit D- bzw. J-Elementen des *TCRD*-Genes rekombiniert werden (Verschuren et al. 1997). Strangaufwärts von V δ 2 gelegene Rekombinationsabschnitte, wie δ Rec, V δ oder V α hingegen, können vermutlich erst nach vorhergehenden Umlagerungen innerhalb von *TCRD* mit J α -Elementen rekombiniert werden. Dies wurde auch anhand von Southern-Blot-Analysen verschiedener δ Rec- ψ J α positiver Thymozyten-Zelllinien bestätigt. In diesen waren zwar V δ 1-J δ 1, D δ 2-D δ 3 und D δ 2-J δ 1-Umlagerungen zu finden, jedoch keine Keimbahnsequenz detektierbar (Verschuren et al. 1997). Auch sequenzierte TRECs lassen darauf schließen, dass ein vorheriges Rearrangement für eine *TCRD*-Deletion vonnöten ist.

Da der δ Rec2-Cluster 3' von V δ 2 liegt, ist durch die geringere Entfernung von D δ - und J δ -Elementen ein Rearrangement mit diesen Genabschnitten wahrscheinlicher als für δ Rec. Dies

kommt auch in allen untersuchten Zellpopulationen gut zum Ausdruck, in denen meist nur $\delta\text{Rec2-D}\delta 3$ und $\delta\text{Rec2-J}\delta 1$, aber nur äußerst selten $\delta\text{Rec2-}\psi\text{J}\alpha$ -Umlagerungen detektiert wurden. Bestätigung erfuhren diese Beobachtungen dadurch, dass in nur einer von acht sequenzierten $\delta\text{Rec2-}\psi\text{J}\alpha$ -Umlagerungen $\text{D}\delta$ -Elemente zu finden waren. Jedoch kann man nachträglich nicht ausmachen, ob es sich um ein direktes oder indirektes Rearrangement von δRec2 mit $\psi\text{J}\alpha$ handelt. Eine Möglichkeit dies zu klären wäre, *signal joints* bzw. TRECs zu messen. Hier würde man, sollte es sich um eine direkte Umlagerung handeln, $\delta\text{Rec2-}\psi\text{J}\alpha$ -TRECs detektieren können und keine $\text{D}\delta 3\text{-}\psi\text{J}\alpha$ -TRECs registrieren. Die geringe Kopienzahl, der potentiell messbaren *signal joints* steht diesem Vorhaben jedoch entgegen. Genauso schwierig wäre es, selbst bei erfolgreicher Messung, eine Aussage zu machen, da $\text{D}\delta 3\text{-}\psi\text{J}\alpha$ -TRECs auch durch andere Rearrangements, in welche $\psi\text{J}\alpha$ involviert ist, generiert werden.

Ein anderer Faktor, der maßgeblich die Deletion des *TCRD* beeinflusst, ist die Transkription des T-early-alpha-Elementes (TEA), ein *TCRD*-Enhancer. Dieses, strangaufwärts von $\psi\text{J}\alpha$ gelegene Element spielt vermutlich eine regulatorische Rolle beim Zugang zum TCR-J α -Genabschnitt. Es ermöglicht so, die zur Deletion von *TCRD* notwendigen $\delta\text{Rec-}\psi\text{J}\alpha$ - bzw. $\delta\text{Rec-J}\alpha 58$ -Rearrangements und wird dann, da 5' von $\psi\text{J}\alpha$ liegend, ebenfalls deletiert (Wilson et al. 1996).

Somit kann, aus vorherigen und in dieser Arbeit gesammelten Daten auf das folgende Rekombinationsschema des *TCRAD*-Lokus geschlossen werden: Die Rekombination beginnt mit einem $\text{D}\delta 2\text{-D}\delta 3$ -Rearrangement, in der Mitte des *TCRD*-Gens. Darauf folgend werden die nächstgelegenen Elemente strangaufwärts ($\delta\text{Rec2.1-2.7}$ oder $\text{V}\delta 2$) bzw. strangabwärts ($\text{J}\delta 1\text{-4}$) mit dem $\text{D}\delta 2\text{-D}\delta 3$ -Komplex verbunden. Findet ein funktionelles $\text{V}\delta 2(\text{D}\delta)\text{J}\delta$ -Rearrangement statt, wird das Gen exprimiert und die Rekombinemaschinerie abgeschaltet. Kommt es zu einem nichtfunktionellen Rearrangement, z.B. $\delta\text{Rec2-J}\delta$ oder *out of frame* $\text{V}\delta 2(\text{D}\delta)\text{J}\delta$, kann der Komplex durch ein $\delta\text{Rec-}\psi\text{J}\alpha$ -Rearrangement deletiert und letztendlich durch Rekombination von $\text{V}\alpha\text{-J}\alpha$ ersetzt werden (siehe Abb. 21).

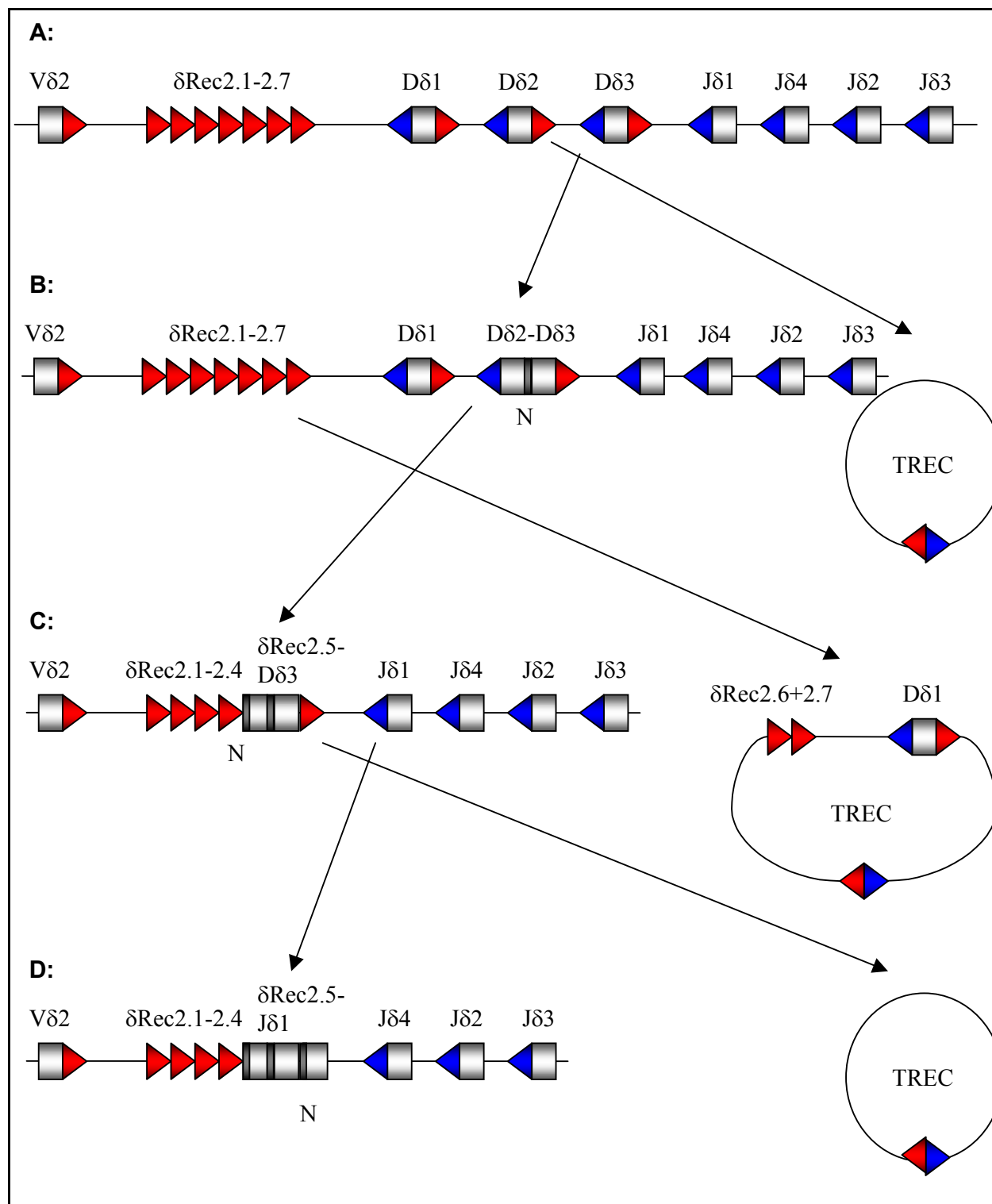


Abb. 26: mögliches Rekombinationsschema bei *TCRD*-Rearrangement unter Einbeziehung von δ Rec2.1-2.7: A: D δ 2-D δ 3-Rearrangement B: atypisches δ Rec2.5-(D δ 2)-D δ 3-Rearrangement C: δ Rec2.5-(D δ 2)-(D δ 3)-J δ 1-Rearrangement D: evtl. Deletion des nichtfunktionellen Rearrangements durch extern liegende Rekombinationselemente (weitere Möglichkeit: komplette Deletion des *TCRD*-Gens durch $V\alpha$ -J α oder δ Rec/ ψ J α -Rekombination)

4.3 Sequenzhomologie und –bedeutung der RSS bei der Erkennung durch den RAG1/RAG2-Komplex

Die neu charakterisierten RSS besitzen strangabwärts keinen sinnvollen *open reading frame* und sind in der Lage mit D δ 3, J δ 1 und ψ J α zu rearrangieren. Sie werden in unterschiedlicher Frequenz umgelagert. Ein Faktor hierfür ist deren spezifische Sequenz. So bestehen RSS immer aus Heptamer, 12 bzw. 23 bp-Spacer und Nonamer. Die Heptamere zeigten eine hohe Übereinstimmung mit der Consensus-Sequenz. Dieses ging soweit, dass die RSS des Heptamers, das identisch mit der Consensussequenz war (δ Rec2.5), auch am häufigsten umgelagert wurde. Zumindest das CAC-Motiv war bei δ Rec2.1-2.7 in allen Heptameren vorzufinden. Diese Daten bestätigen damit Arbeiten von Hesse et al. 1989 und anderen. Spacer oder Nonamer der RSS spielten offensichtlich eine weniger bedeutende Rolle und waren nur gering (Nonamer) oder gar nicht konserviert (Spacer) (siehe Abb.15). Das steht mit Arbeiten im Widerspruch, in denen dem Nonamer und sogar dem Spacer (Ramsden et al. 1994; Nadel et al. 1998) sehr wohl eine, die Erkennungsfrequenz der V(D)J-Rekombinase erhöhende Eigenschaft, zugesprochen wird. Bei den jedoch relativ selten auftretenden Umlagerungen des δ Rec2-Clusters, kann man solch einen Effekt nicht mehr ausmachen. Natürlich spielen hierbei auch andere Faktoren eine Rolle, beispielsweise die DNA-Methylierung aber auch Histonkomplexe und deren Acetylierungszustand, die den Zugriff des RAG-Komplexes zu bestimmten DNA-Abschnitten beschränken (Kwon et al. 1998, Krangel et al. 2001). Weitere Faktoren, die hier ebenfalls eingreifen, sind in der Nähe liegende Promotoren oder Enhancer- bzw. Silencer-Elemente, die Rearrangement und Transkription eines Genabschnittes vervielfachen oder vermindern können (Winoto et al. 1989, Redondo et al. 1990, Mc Murry et al. 1997, Zhong et al. 1997). Dies geschieht meist ebenfalls durch Modulation der Chromatinstruktur (Roth et al. 2000) und der Acetylierungsrate von Histonkomplexen (Stanhope-Baker et al. 1996).

Interessant war auch die genaue Analyse der Verknüpfungsregionen. Rearrangements mit D δ 3 enthielten nie D δ 2. In vier Fällen wurde die 12-RSS von D δ 3 überhaupt nicht erkannt und dafür die 3' davon gelegene 23-RSS als Schnittstelle der V(D)J-Rekombinase benutzt. Dies ist auch schon aus anderen Arbeiten bekannt (Breit et al. 1993, Carroll et al. 1993, Seriu et al. 1997), jedoch nie in der für dieses geringe Probenkontingent beobachteten Zahl. Solche aberranten Umlagerungen müssen deletiert werden, da weder δ Rec2-RSS, noch diese spezielle D δ 3-RSS an codierende Sequenzen geknüpft ist. Dies ist ein weiterer Beweis für den hohen Grad an

Unbestimmtheit der V(D)J-Rekombinase und beeinflusst damit das produktive Potential des *TCRD*-Lokus.

Bei Mäusen wurden bisher drei δ Rec-analoge Genabschnitte gefunden. Das in Mäusen vorkommende Element δ Rec1 ist ein Homolog zum menschlichen δ Rec und wie dieses in die Deletion des *TCRD* involviert (Hockett et al. 1989). Jedoch wird es in geringerer Frequenz rearrangiert als sein humanes Pendant (Takeshita et al. 1989). Menschliche Homologe von murinen δ Rec2- und δ Rec3-Elementen wurden bisher nicht beschrieben. Der Vergleich der Nukleotid-Sequenz des humanen δ Rec2.1-2.7-Genclusters mit der analogen Region des murinen *TCRD*-Gens zeigte eine Gesamthomologie der Sequenz von 55%, während δ Rec beim Menschen und δ Rec1 bei Mäusen zu 58% konserviert sind. Somit war zwar die Gesamthomologie der δ Rec-Regionen beider Spezies ähnlich (δ Rec-Region: 58%, δ Rec2-Region: 55%), die RSS von δ Rec2.1-2.7 waren jedoch deutlich geringer konserviert (54-72%) als die von δ Rec (79%). Insbesondere an den umlagerungssensitiven Bereichen der RSS, den Heptameren und Nonameren, war dies der Fall (siehe Tabelle 21). Besonders diese waren beim Vergleich von murinem δ Rec1 und humanem δ Rec hoch konserviert. Somit ist anzunehmen, dass den δ Rec2-Elementen bei der *TCRD*-Deletion in Mäusen kaum Bedeutung zukommt.

4.4 Ausblick

Der analysierte Cluster von Rekombinationselementen ist am stochastischen Prozess der Rekombination und Differenzierung zum *TCRA* bzw. Deletion des *TCRD* beteiligt. Wie in der Einleitung beschrieben, sind bei der Charakterisierung von Rearrangements akuter Leukämien im Rahmen der *Minimal Residual Disease*-Diagnostik ca. 20% (pre-B-ALL) bzw. 30% (T-ALL) per PCR oder Restriktionsfragmentlängenanalyse nicht zuordenbar (Breit et al. 1993, Schmidt et al. 1996). Zumindest ein Teil dieser nicht charakterisierbaren Rearrangements könnte nun geklärt werden.

In einem früher untersuchten Gesamtkollektiv von 29 ALL zeigten neun atypische *TCRD*-Rearrangements (Schmidt et al. 1996). In einer dieser akuten Leukämien, einer AML mit lymphatischen Markern, wurde ein δ Rec2.1-J δ 1-Rearrangement identifiziert (Przybylski et al. 2001). In der vorliegenden Arbeit schließlich wurde eine δ Rec2.5-J δ 1-Umlagerung in einer aus einer T-ALL entstandenen Zelllinie (DND41) nachgewiesen. Somit scheint zumindest ein Teil von akuten Leukämien mit atypischen *TCRD*-Gen-Rearrangements δ Rec2-Umlagerungen zu

besitzen. Durch die Monoklonalität bei Leukämien/Lymphomen wird auch solch eine, sonst eher seltene Umlagerung, enorm vervielfacht, was die Detektion mittels weniger PCR-Zyklen ermöglicht. Hierbei könnte der ganze δ Rec2-Cluster durch einen 5' von δ Rec2.1 gelegenen Primer abgedeckt werden. Dieser würde sich in die üblichen Multiplex-PCRs einfach integrieren lassen. Denkbar wäre, als nächstes an einem größeren Kollektiv von Patienten abzuklären, wie häufig die δ Rec2-Umlagerungen als Klonalitätsmarker bei ALL und AML mit positiven lymphatischen Markern involviert sind.

Es ist sehr wahrscheinlich, dass im Zusammenhang mit der Analyse weiterer unklarer Rearrangements des *TCRD* noch andere atypische Umlagerungsstellen gefunden werden. Auch diese würden einen kleinen Beitrag dazu leisten, die bestehende Diagnose-Lücke zu verkleinern. Auch besteht die Möglichkeit, dass strangaufwärts von V δ 2 gelegene Umlagerungselemente, ähnlich wie δ Rec, noch eher in die Deletion von *TCRD* involviert wären.

Abschließend wäre es von Interesse, inwieweit die gefundenen Rearrangements, insbesondere die, den größten Teil ausmachenden, δ Rec2.5-D δ 3- bzw. δ Rec2.5-J δ 1-Umlagerungen, exprimiert werden. Vermutlich kommt ihnen jedoch nur eine, die Deletion des *TCRD* begünstigende Funktion, auf dem Differenzierungsweg zum reifen α/β -T-Lymphozyten, zu. Selbst wenn eine Expression festgestellt werden könnte, wäre es höchst unwahrscheinlich, dass diese RNA dann in ein Protein übersetzt und funktionell wird. Denkbar ist auch, dass dieses Transkript den RAG1/RAG2-Komplex erneut aktiviert und somit neue, funktionelle Umlagerungen, ermöglicht. Somit erschließt sich mit dieser und anderen Arbeiten immer mehr ein Prozess, der von zahlreichen Variablen abhängig ist, aber nur bedingt zufällig abläuft.

5 Zusammenfassung

In den letzten Jahren erlangte die Möglichkeit der Überwachung der minimalen Resterkrankung von Malignomen des lymphatischen Systems einen immer höheren Stellenwert für deren Therapie. Neben entitätsspezifischen Translokationen werden hierfür auch klonspezifische Rearrangements von T-Zell-Rezeptor- oder Immunglobulingenen genutzt. Da es nur eine begrenzte Zahl von T-Zell-Rezeptor δ -Rekombinationselementen gibt, eignet sich dieser gut für die Bestimmung von klonspezifischen Rearrangements. Jedoch ließen sich bei Untersuchungen von Patientenproben nie alle im Southern-Blot gefundenen Banden einem der möglichen Rearrangements von *TCRD* zuordnen. Weitergehende Untersuchungen ergaben, dass Rekombinationen nicht nur mit Signalerkennungssequenzen codierender Elemente stattfinden. Es werden auch freie, nicht an codierende Elemente geknüpfte RSS von der V(D)J-Rekombinase erkannt. Dass dies auch bei gesunden Individuen nicht selten ist, zeigen u. a. die hier dargelegten Daten.

Die vorliegende Arbeit beschreibt einen neuen Cluster von insgesamt sieben T-Zell-Rezeptor δ -Rekombinationselementen (δ Rec2.1-2.7), welcher sich innerhalb des *TCRD*-Gens, 2,6-5,2 kb 3' des variablen Gensegments V δ 2, befindet. Gezeigt wurde, dass diese isolierten *recombination signal sequences* sowohl mit *diversity*- (D δ 3) als auch mit *joining*-Elementen (J δ 1) des *TCRD*-Gens und *pseudo joining*-Gensegmenten (ψ J α) des *TCRA*-Gens rearrangiert werden. Rearrangements, die δ Rec2-Elemente enthielten, wurden in allen zehn Proben peripherer Leukozyten gesunder Spender gefunden, obwohl sie hundertfach seltener sind als klassische δ Rec-Rearrangements.

Um zu einer quantitativen Aussage zu gelangen, wurden die Proben mittels Multiplex-nested-PCR untersucht und anschließend die Häufigkeit für jedes Rearrangement bestimmt. Die absolute Frequenz der δ Rec2-Rearrangements in PB-T-Zellen war, verglichen mit der in Thymozyten, niedriger, was nahe legt, dass sie während der T-Zell-Ontogenese deletiert werden. Am auffälligsten war das Verschwinden von δ Rec2-D δ 3-Umlagerungen, deren Häufigkeit in PB-T-Zellen elffach niedriger als in Thymozyten ist. Die überwiegende Mehrheit der δ Rec2-J δ 1-Rearrangements enthielt das D δ 3-Element an der Verknüpfungsstelle. Dies bedeutet, dass δ Rec2-RSS zunächst mit D δ 3 rekombiniert werden, danach weiter zu δ Rec2-J δ 1 rearrangiert werden können und letztendlich durch V α -J α - bzw. δ Rec-J α -Rekombinationen deletiert werden.

Im Gegensatz zu dieser Hypothese steht, dass die Mehrheit der $\delta\text{Rec2-}\psi\text{J}\alpha$ -Umlagerungen kein D δ 3-Segment enthielt, was vermutlich daher rührt, dass sie nicht aus $\delta\text{Rec2-D}\delta$ 3-Rearrangements entstehen.

Verschiedene Zellpopulationen wurden darauf hin untersucht, ob sich signifikante Zelllinienspezifitäten der Rearrangements finden lassen würden. Die Umlagerungen $\delta\text{Rec2-J}\delta$ 1- und $\delta\text{Rec2-}\psi\text{J}\alpha$ scheinen T-Zell-spezifisch zu sein, $\delta\text{Rec2-D}\delta$ 3-Rearrangements hingegen wurden auch in B-Lymphozyten und NK-Zellen in geringer Zahl nachgewiesen, was gut mit schon bekannten Daten von δRec -Umlagerungen korreliert.

Zusammenfassend zeigen diese Daten, dass $\delta\text{Rec2-Rearrangements}$ wahrscheinlich vorübergehende Schritte des Rekombinationsprozesses des *TCRAD*-Lokus sind und durch nachfolgende $\text{V}\alpha\text{-J}\alpha$ -Rearrangements deletiert werden können. Ähnlich wie die klassischen δRec -Umlagerungen, spielen vermutlich auch $\delta\text{Rec2-Rearrangements}$ eine Rolle auf dem Wege der Differenzierung von T-Lymphozyten hin zur reifen $\text{TCR}\alpha\beta$ -Zelle. Die hier erstmals beschriebenen Umlagerungen könnten darüber hinaus in der MRD-Diagnostik maligner lymphatischer Erkrankungen die bisher genutzten Rearrangements ergänzen und ebenso als Verlaufsmarker genutzt werden.

Literaturverzeichnis

1. Adriaansen HJ, et al. Immunoglobulin and T-cell receptor rearrangements in acute non-lymphocytic leukemias. Analysis of 54 cases and a review of the literature. *Leukemia*, 1991, 5, S.744-751
2. Aifantis I, et al. On the Role of the Pre-T Cell Receptor in $\alpha\beta$ versus $\gamma\delta$ T Lineage Commitment. *Immunity*, 1998, 9, S.649-655
3. Akamatsu Y, et al. Essential residues in V(D)J recombination signals. *J Immunol*, 1994, 153, S.4520-4529
4. Akira S, Okazaki K, Sakano H Two pairs of recombination signals are sufficient to cause immunoglobulin V-(D)-J joining. *Science*, 1987, 238, S.1134-1138
5. Alt FW, et al. Regulation of genome rearrangement events during lymphocytic differentiation. *Immunol Rev*, 1986, 8, S.95-30
6. Altschul SF, et al. Basic local alignment search tool. *J Mol Biol*, 1990, 21, S.5403-5410
7. Asou N, et al. Rearrangements of T-cell antigen receptor δ chain gene in hematologic neoplasms. *Blood*, 1989, 74, S.2707-2712
8. Bassing CH, et al. Recombination signal sequences restrict chromosomal V(D)J recombination beyond the 12/23 rule. *Nature*, 2000, 405, S.583-586
9. Biondi A, et al. T-cell receptor δ gene rearrangement in childhood T-cell acute lymphoblastic leukemia. *Blood*, 1989, 73, S.2133-2138
10. Biondi A, et al. High prevalence of T-cell receptor V δ 2-(D)-D δ 3 or D δ 3 rearrangements in B-precursor acute lymphoblastic leukemias. *Blood*, 1990, 75, S.1834-1840
11. Blom B TCR gene rearrangements and expression of the pre-T cell receptor complex during human T-cell differentiation. *Blood*, 1999, 9, S.3033-3043
12. Böcker W, Denk H, Heitz PU *Pathologie*, 1, München, Urban und Schwarzenberg, 1997, 3-541-15891-3
13. Bockheim Steen S, et al. Initiation of V(D)J recombination in vivo: role of recombination signal sequences in formation of single and paired double-strand breaks. *EMBO J*, 1997, 16, S.2656-2664
14. Boysen C, et al. Analysis of the 1.1-Mb human α/δ T-cell receptor locus with bacterial artificial chromosome clones. *Genome Res*, 1997, 7, S.330-338
15. Breit TM, Verschuren MCM, Wolvers-Tettero I LM, van Gastel-Mol EJ, Hählen K, van Dongen JJM Human T cell leukemias with continuous V(D)J recombinase activity for TCR- δ gene deletion. *J Immunol*, 1997, 159, S.4341-4349
16. Breit TM, Wolvers-Tettero ILM, Beishuizen A, Verhoeven M-AJ, van Wering ER, van Dongen JJ M Southern Blot Patterns, Frequencies, and Junctional Diversity of T-Cell Receptor- δ Gene Rearrangements in Acute Lymphoblastic Leukemia. *Blood*, 1993, 82, S.3063-3074
17. Brisco MJ, et al. Detection and quantitation of neoplastic cells in acute lymphoblastic leukaemia, by use of the polymerase chain reaction. *Br J Haematol*, 1991, 79(2), S.211-217
18. Cantrell D T cell receptor signal transduction pathways. *Annu Rev Immunol*, 1996, 14, S.259-274
19. Carroll AM, et al. V(D)J recombination generates a high frequency of nonstandard TCR δ -associated rearrangements in thymocytes. *J Immunol*, 1993, 150, S.2222-2230
20. de Villartay JP, et al. Deletional rearrangement in the human T-cell receptor α -chain locus. *Proc Natl Acad Sci*, 1987, 84, S.8608-8612

21. de Villartay JP, et al. The differentiation of human pro-thymocytes along the TCR-alpha/beta pathway in vitro is accompanied by the site-specific deletion of the TCR-delta locus. *Int Immunol*, 1991, 3, S.1301-1305
22. de Villartay JP, Hockett RD, Coran D, Korsmeyer SJ, Cohen DI Deletion of the human T-cell receptor d-gene by a site-specific recombination. *Nature*, 1988, 335, S.170-174
23. Dyer MJS T-cell receptor d/a rearrangements in lymphoid neoplasms. *Blood*, 1989, 74, S.1073-1083
24. Early P, et al. An immunoglobulin heavy chain variable region gene is generated from three segments of DNA: VH, D and JH. *Cell*, 1980, 19, S.981-992
25. Eastman QM, Leu TMJ, Schatz DG Initiation of V(D)J recombination in vitro obeying the 12/23 rule. *Nature*, 1996, 380, S.85-88
26. Fink PJ, McMahan CJ Lymphocytes rearrange, edit and revise their antigen receptors to be useful yet safe. *Immunol Tod*, 2000, 11, S.561-566
27. Fontenay M, et al. T cell receptor d rearrangements occur predominantly in immature myeloid leukemias exhibiting lineage promiscuity. *Leukemia*, 1990, 4, S.100-105
28. Gilfillan S, et al. Mice lacking TdT: mature animals with an immature lymphocyte repertoire. *Science*, 1993, 261, S.1175-1178
29. Guidos CJ Positive selection of CD4+ and CD8+ T cells. *Curr Opin Immunol*, 1996, 8(2), S.225-232
30. Hansen-Hagge TE, et al. Human common acute lymphoblastic leukemia-derived cell lines are competent to recombine their T-cell receptor delta/alpha regions along a hierarchically ordered pathway. *Blood*, 1992, 80(9), S.2353-2362
31. Hansen-Hagge, et al. Detection of minimal residual disease in acute lymphoblastic leukemia by in vitro amplification of rearranged T-cell receptor delta chain sequences. *Blood*, 1989, 74(5), S.1762-1767
32. Hara J, et al. Differential usage of delta recombining element and V delta genes during T-cell ontogeny. *Blood*, 1991, 78, S.2075-2081
33. Hara J, et al. Developmental process of the T-cell receptor a and d gene assembly in B-cell precursor acute lymphoblastic leukaemia. *Br J Haematol*, 1991, 78, S.180-186
34. Hata S, et al. Extensive junctional diversity of rearranged human T cell receptor d genes. *Science*, 1988, 240, S.1551-1554
35. Havran WL, Allison JP Developmentally ordered appearance of thymocytes expressing different T-cell antigen receptors. *Nature*, 1988, 335, S.443-445
36. Hernandez-Munain C, et al. A developmental switch from TCRd enhancer to TCRA enhancer function during thymocyte maturation. *Immunity*, 1999, 10, S.723-733
37. Hesse JE, et al. Extrachromosomal DNA substrates in pre-B cells undergo inversion or deletion at immunoglobulin V-(D)-J joining signals. *Cell*, 1987, 49, S.775-783
38. Hesse JE, et al. V(D)J recombination: a functional definition of the joining signals. *Genes Dev*, 1989, 3(7), S.1053-1061
39. Hettinger K, et al. Multiplex PCR for TCR delta rearrangements: a rapid and specific approach for the detection and identification of immature and mature rearrangements in ALL. *Br J Haematol*, 1998, 102, S.1050-1054
40. Hochstenbach F, Brenner MB T-cell receptor d-chain can substitute for a to form a bd heterodimer. *Nature*, 1989, 340, S.562
41. Hochtl J, Zachau HG A novel type of aberrant recombination in immunoglobulin genes and its implications for V-J joining mechanism. *Nature*, 1983, 302, S.260-263
42. Hockett RD Jr., Nunez G, Korsmeyer SJ Evolutionary comparison of murine and human delta T-cell receptor deleting elements. *New Biol*, 1989, 1, S.266-274

43. Hockett RD, et al. Human T-cell antigen receptor (TCR) delta-chain locus and elements responsible for its deletion are within the TCR alpha-chain locus. *Proc Natl Acad Sci*, 1988, 85, S.9694-9698
44. Ismaili J, Antica M, Wu L CD4 and CD8 expression and T cell antigen receptor gene rearrangement in early intrathymic precursor cells. *Eur J Immunol*, 1996, 26, S.731-737
45. Isobe M, et al. Cloning of the gene encoding the d subunit of the human T-cell receptor reveals its physical organization within the a-subunit locus and its involvement in chromosome translocations in T-cell malignancy. *Proc Natl Acad Sci*, 1988, 85, S.3933-3937
46. Janeway CA, Travers P *Immunologie*, 2, Heidelberg, Berlin, Oxford, Spektrum Akademischer Verlag GmbH, 1997, 3-8274-0149-6
47. Kaufmann SHE gamma/delta and other unconventional T lymphocytes: What do they see what do they do? *Proc Natl Acad Sci*, 1996, 93, S.2272-2279
48. Komori T, Sugiyama H, Kishimoto S A novel VHDJH to JH joining that induces H chain production in an Ig-null immature B cell line. *J Immunol*, 1989, 143, S.1040-1045
49. Komori, et al. Lack of N regions in antigen receptor variable region genes of TdT-deficient lymphocytes. *Science*, 1993, 261, S.1171-1175
50. Krangel MS V(D)J Recombination Becomes Accessible. *J Exp Med*, 2001, 7, S.F27-F30
51. Kruisbeek, et al. Branching out to gain control: how the pre-TCR is linked to multiple functions. *Immunol Tod*, 2000, 21, S.637-644
52. Kwon J, et al. Accessibility of nucleosomal DNA to V(D)J cleavage is modulated by RSS positioning and HMG1. *Mol Cell*, 1998, 2, S.829-839
53. Lauzurica P, Krangel MS Enhancer-dependent and -independent steps in the rearrangement of a human T cell receptor delta transgene. *J Exp Med*, 1994, 179(1), S.43-55
54. Lewis SM The mechanism of V(D)J joining: Lessons from molecular, immunological, and comparative analyses. *Adv Immunol*, 1994, 56, S.27-150
55. Lewis SM, Wu GE The Origins of V(D)J Recombination. *Cell*, 1997, 88, S.159-162
56. Lewis SM, Wu GE The old and the restless. *J Exp Med*, 2000, 191, S.1631-1635
57. Li A-H, Rosenquist R, Forestier E, Holmberg D, Lindh J, Löfvenberg E, Roos G Clonal rearrangements in childhood and adult precursor B acute lymphoblastic leukemia: a comparative polymerase chain reaction study using multiple sets of primers. *Eur J Haematol*, 1999, 63, S.211-218
58. Lie YS, Petropoulos CJ Advances in quantitative PCR technology: 5' nuclease assays. *Curr Op Biotech*, 1998, 9, S.43-48
59. Lindsten T, et al. Transient rearrangements of the T cell antigen receptor alpha locus in early thymocytes. *J Exp Med*, 1987, 166, S.761-775
60. Livak F, et al. Genetic modulation of T cell receptor gene segment usage during somatic recombination. *J Exp Med*, 2000, 192, S.1191-1196
61. Livak F, Petrie HT, Crispe IN, Schatz DG In-frame TCR gene rearrangements play a critical role in the beta/gamma cell lineage decision. *Immunity*, 1995, 2, S.617-627
62. Livak F, Tourigny M, Schatz DG, Petrie HT Characterization of TCR gene rearrangements during adult murine T cell development. *J Immunol*, 1999, 162, S.2575-2580
63. Loh EY, et al. Identification and sequence of a fourth human T cell antigen receptor chain. *Nature*, 1987, 330, S.569-572
64. Loh EY, et al. Human T-cell receptor d chain. Genomic organization, diversity, and expression in populations of cells. *Proc Natl Acad Sci*, 1988, 85, S.9714-9718

65. Loiseau P, et al. Rearrangements of the T cell receptor delta gene in T acute lymphoblastic leukemia cells are distinct from those occurring in B lineage acute lymphoblastic leukemia and preferentially involve one V delta gene segment. *J Immunol*, 1989, *142*, S.3305-3311
66. Max EE, Seidman JG, Leder P Sequences of five potential recombination sites encoded close to an immunoglobulin kappa constant region gene. *Proc Natl Acad Sci*, 1979, *76*, S.3450-3454
67. Mc Gargill MA, et al. Receptor editing in developing T cells. *Nature Immunol*, 2000, *1*, S.336-341
68. Mc Murry MT, et al. Enhancer control of local accessibility to V(D)J recombinase. *Mol Cell Biol*, 1997, *17*, S.4553-4561
69. Migone, et al. Restriction of the T-cell receptor V delta gene repertoire is due to preferential rearrangement and is independent of antigen selection. *Immunogenetics*, 1995, *42*, S.323-332
70. Moore MW, et al. Deletions of kappa chain constant region genes in mouse lambda chain-producing B cells involve intrachromosomal DNA recombinations similar to V-J joining. *Proc Natl Acad Sci*, 1985, *82(18)*, S.6211-6215
71. Moretta L, et al. Molecular and cellular analysis of human T lymphocytes expressing g/d T-cell receptor. *Immunol Rev*, 1991, *120*, S.117-135
72. Nadel B, Tang A, Escuro G, Lugo G, Feeney AJ Sequence of the spacer in the recombination signal sequence affects V(D)J rearrangement frequency and correlates with nonrandom Vkappa usage in vivo. *J Exp Med*, 1998, *187*, S.1495-1503
73. Nyvold C, Madsen HO, Ryder LP, Seyfarth J, Engel CA, Svejgaard A, Wesenberg F, Schmiegelow K Competitive PCR for quantification of minimal residual disease in acute lymphoblastic leukaemia. *J Immunol Meth*, 2000, *233*, S.107-118
74. Oettinger MA, et al. RAG-1 and RAG-2, adjacent genes that synergistically activate V(D)J recombination. *Science*, 1990, *248*, S.1517-1523
75. Petrie HT, Livak F, Schatz DG, Strasser A, Crispe IN, Shortman K Multiple rearrangements in T cell receptor alpha chain genes maximize the production of usefull thymocytes. *J Exp Med*, 1993, *178*, S.615-622
76. Pongers-Willems MJ, et al. Real-time quantitative PCR for the detection of minimal residual disease in acute lymphoblastic leukemia using junctional region specific TaqMan probes. *Leukemia*, 1998, *12*, S.2006-2014
77. Przybylski G, et al. Characterization of illegitimate TCRd gene rearrangements in acute myeloid leukemia. *Br J Haematol*, 1994, *87*, S.301-307
78. Przybylski G, et al. Novel T-cell receptor d gene rearrangement involving a recombining element located 2.6 kb 3' from the Vd2 gene segment. *Leuk Res*, 2001, *25*, S.1059-1065
79. Przybylski G, et al. Identification of a new cluster of T-cell receptor delta recombining elements. *Immunology*, 2003, *108*, S.16-23
80. Ramsden DA, Baetz K, Wu GE Conservation of sequence in recombination signal sequence spacers. *Nucleic Acids Res*, 1994, *22*, S.1785-1796
81. Redondo JM, et al. A T cell-specific transcriptional enhancer within the human T cell receptor delta locus. *Science*, 1990, *247*, S.1225-1229
82. Reth M, et al. A novel VH to VHDJH joining mechanism in heavy-chain-negative (null) pre-B cells results in heavy-chain production. *Nature*, 1986, *322(6082)*, S.840-842
83. Roth DB, Roth SY Unequal access: Regulating V(D)J recombination through chromatin remodeling. *Cell*, 2000, *103*, S.699-702
84. Sadofsky MJ The RAG proteins in V(D)J recombination: more than just a nuclease. *Nucleic Acids Res*, 2001, *29*, S.1399-1409
85. Saiki RK, et al. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science*, 1988, *239*, S.487-491
86. Sakano H, et al. Sequences at somatic recombination sites of immunoglobulin light-chain genes. *Nature*, 1979, *280*, S.288-294

87. Sakano H, et al. Two types of somatic recombination are necessary for the generation of complete immunoglobulin heavy-chain genes. *Nature*, 1980, *286*, S.676-683
88. Sakano H, et al. Identification and nucleotide sequence of a diversity DNA segment (D) of immunoglobulin heavy-chain genes. *Nature*, 1981, *290*, S.562-565
89. Satyanarayana K, et al. Genomic organization of the human T-cell antigen-receptor α/δ locus. *Proc Natl Acad Sci*, 1988, *85*, S.8166-8170
90. Schatz DG, Oettinger MA, Schlissel MS V(D)J recombination: molecular biology and regulation. *Annu Rev Immunol*, 1992, *10*, S.359-383
91. Schmidt C. A., Przybylski G., Seeger K., Siegert W. TCR δ Gene Rearrangements in Acute Myeloid Leukemia with T-lymphoid Antigen Expression *Leuk. Lymph.*, 1995, *20*, S.45-49
92. Schmidt CA, et al. Rearrangements of the T-cell receptor δ , γ and β genes in acute myeloid leukemia coexpressing T-lymphoid features. *Leukemia*, 1992, *6*, S.1263-1267
93. Schmidt CA, et al. Heterogeneity of V δ 2 TCR δ gene rearrangements in acute myeloid leukemia. *Leuk Lymphoma*, 1994, *16*, S.73-77
94. Schmidt CA, Przybylski G, Tietze A, Oettle H, Siegert W, Ludwig WD Acute myeloid an T-cell acute lymphoblastic leukaemia with aberrant antigen expression exhibit similar TCR δ gene rearrangements. *Br J Haematol*, 1996, *92*, S.929-936
95. Seeger KH, et al. Unusual T-cell receptor- δ gene rearrangement patterns revealed by screening of a large series of childhood acute lymphoblastic leukaemia by multiplex polymerase chain reaction. *Br J Haematol*, 2001, *113*, S.318-322
96. Seriu T, et al. Improved detection of minimal residual leukemia through modifications of polymerase chain reaction analyses based on clonospecific T cell receptor junctions. *Leukemia*, 1995, *9*, S.316-320
97. Seriu T, et al. T cell receptor D δ 2D δ 3 rearrangement: a suitable allele-specific marker for the detection of minimal residual disease in childhood acute lymphoblastic leukemia *Leukemia*, 1997, *11*, S.759-761
98. Shimizu T, Iwasato T, Yamagishi H Deletions of immunoglobulin C kappa region characterized by the circular excision products in mouse splenocytes. *J Exp Med*, 1991, *173*(5), S.1065-1072
99. Sotzik F, et al. Surface antigens of human thymocyte populations defined by CD3, CD4 and CD8 expression: CD1a is expressed by mature thymocytes but not peripheral T cells. *Immunol Lett*, 1993, *36*, S.101-106
100. Stanhope-Baker P, et al. Cell type-specific chromatin structure determines the targeting of V(D)J recombinase activity in vitro. *Cell*, 1996, *85*, S.887-897
101. Takeshita S, et al. Excision products of the T cell receptor gene support a progressive rearrangement model of the α/δ locus. *EMBO*, 1989, *11*, S.3262-3270
102. Takiyama Y, et al. Sequence and organization of the diversity, joining, and constant region genes of the humans T-cell δ -chain locus. *Proc Natl Acad Sci*, 1988, *85*, S.6097-6101
103. Takiyama Y, et al. Diversity and structure of human T cell receptor δ chain genes in peripheral blood gamma/ δ -bearing T lymphocytes. *J Exp Med*, 1989, *169*, S.393-405
104. Tonegawa S Somatic generation of antibody diversity. *Nature*, 1983, *302*, S.575-581
105. Tycko B, Sklar J Chromosomal translocations in lymphoid neoplasia: a reappraisal of the recombinase model. *Cancer Cells*, 1990, *2*, S.1-8
106. Valetto A, et al. Detection of T cell receptor δ gene rearrangements in childhood B and T lineage acute lymphoblastic leukaemia by southern blot and PCR: technical comparison of two methods of analysis. *Clin Lab Haem*, 2000, *22*, S.263-269
107. van der Stoep, et al. Analysis of early fetal T-cell receptor δ chain in humans. *Immunogenetics*, 1990, *32*, S.331-336

108. van Dongen JJM, et al. Prognostic value of minimal residual disease in acute lymphoblastic leukaemia in childhood. *Lancet*, 1998, 352, S.1731-1738
109. van Gent DC, Ramsden DA, Gellert M The RAG1 and RAG2 proteins establish the 12/23 rule in V(D)J recombination. *Cell*, 1996, 85, S.107-113
110. Verschuren MCM, Wolvers-Tettero ILM, Breit TM, Noordzij J, van Wering ER, van Dongen JJM Preferential rearrangements of the T cell receptor-d-deleting elements in human T cells. *J Immunol*, 1997, 158, S.1208-1216
111. Verschuren MCM, Wolvers-Tettero ILM, Breit TM, van Dongen JJM T-cell receptor Vd-Ja rearrangements in human thymocytes: the role of Vd-Ja rearrangements in T-cell receptor-d gene deletion. *Immunology*, 1998, 93, S.208-212
112. von Boehmer H, et al. Pleiotropic changes controlled by the pre-T-cell receptor. *Curr Opin Immunol*, 1999, 11, S.135-142
113. Wilson A, et al. T-cell receptor delta gene rearrangement and T early alpha (TEA) expression in immature alpha beta lineage thymocytes: Implications for alpha beta/ gamma delta lineage commitment. *Immunity*, 1996, 4, S.37-45
114. Winoto A, Baltimore D Alpha beta lineage-specific expression of the alpha T cell receptor gene by nearby silencers. *Cell*, 1989, 59, S.649-655
115. Yokota S, et al. Use of polymerase chain reaction to monitor minimal residual disease in acute lymphoblastic leukemia patients. *Blood*, 1991, 77, S.331-339
116. Yumura-Yagi K, et al. Clinical significance of CD/7-positive stem cell leukemia. A distinct subtype of mixed lineage leukemia. *Cancer*, 1991, 68, S.2273-2280
117. Zhong X-P, Krangel MS An enhancer-blocking element between alpha and delta gene segments within the human T cell receptor alpha/delta locus. *Proc Natl Acad Sci*, 1997, 94, S.5219-5224

Danksagung

Sehr herzlich danken möchte ich Prof. Dr. C.A. Schmidt für die Überlassung des Themas und die wissenschaftliche Betreuung dieser Arbeit.

Mein besonderer Dank gilt Dr. Grzegorz Przybylski, der mich in die anfangs schwierig zu verstehende Materie der Rearrangements und Translokationen einführte bzw. mich dafür zu begeistern wusste und mir bei Problemen mit Rat und Tat zur Seite stand sowie stets für Diskussionen offen war.

Ebenso danke ich Katja Schultheis, Bärbel Pawlaczek und Jutta Laser für die hervorragende Unterstützung und hilfreiche Tipps im Laboralltag.

Herrn Professor Dr. S. Serke, der leider inzwischen verstorben ist und Frau A. van Lessen danke ich für die Sortierung der Zellpopulationen.

Herrn Professor Dr. J.J.M. van Dongen und Herrn Professor M.C.M. Verschuren gebührt Dank für die Überlassung der Zelllinie DND41 und sortierten Thymozytenproben sowie die kritische Diskussion der Ergebnisse.

Meinen Eltern und meiner Freundin danke ich für die Geduld, die sie aufbringen mussten und für das kritische Durchlesen der Arbeit.

Erklärung

Hiermit erkläre ich an Eides Statt, dass die vorliegende Arbeit von mir selbst und ohne unzulässige Hilfe Dritter verfasst wurde, auch in Teilen keine Kopie anderer Arbeiten darstellt und die benutzten Hilfsmittel sowie die Literatur vollständig angegeben sind.

Berlin, den 18. Juli 2005

Lebenslauf

Persönliche Angaben

Name: Jens Wanzeck
Geburtsdatum: 29. September 1974
Geburtsort: Berlin
E-Mail: jens.wanzeck@web.de

Ausbildung

1981 – 1988 Polytechnische Oberschule, Berlin-Marzahn
1988 – 1991 Kinder- und Jugendsportschule, Berlin-Köpenick
1991 – 1994 Flatow-Gesamtschule, Berlin-Köpenick
07/1994 Erlangung der Hochschulreife
1994 – 1995 Freiwilliges Soziales Jahr
1995 – 1996 Tätigkeit beim häuslichen Krankenpflagedienst „MEDIAVITA“
1996 – 2003 Studium der Humanmedizin an der Humboldt-Universität Berlin, Charité
05/2003 Teilapprobation
01/2005 Approbation

Praktisches Jahr

04/2002 – 08/2002 Hämatologie/Onkologie, Robert-Rössle-Klinik, Charité, Berlin
08/2002 – 10/2002 Chirurgie, Königin Elisabeth Herzberge Krankenhaus, Berlin
10/2002 – 12/2002 Chirurgie, Raigmore-Hospital, Inverness, Großbritannien
12/2002 – 03/2003 Anästhesiologie, Charité, Berlin

Berufstätigkeit

2003 – 2004 Arzt im Praktikum an der Klinik für Hämatologie/Onkologie der Ernst-Moritz-Arndt-Universität Greifswald
2004 – 2005 Stipendiat der A. Krupp von Bohlen und Halbach Stiftung am J. G. Brown Cancer Center/University of Louisville, Kentucky, USA

Berlin, den 18. Juli 2005

Publikationsliste

Gemeinsame Jahrestagung der DGHO/ÖGHO in Graz, Okt. 2000, Poster: Identifizierung eines neuen TCRd Rec Genclusters, Przybylski G, **Wanzeck J**, Verschuren MCM, van Dongen JJM, Serke S, Schmidt CA, Poznan, Berlin, Rotterdam

Przybylski G, **Wanzeck J**, Verschuren MCM, van Dongen JJM, Serke S, Schmidt CA Identification of a new cluster of T-cell receptor delta recombining elements. *Immunology*, 2003, 108, S.16-23

Przybylski GK, Dik WA, **Wanzeck J**, Grabarczyk P, Majunke S, Martin-Subero JJ, Siebert R, Dolken G, Ludwig WD, Verhaaf B, van Dongen JJ, Schmidt CA, Langerak AW. Disruption of the BCL11B gene through inv(14)(q11.2q32.31) results in the expression of BCL11B-TRDC fusion transcripts and is associated with the absence of wild-type BCL11B transcripts in T-ALL. *Leukemia*. 2005 Feb;19(2):201-8.

Wysoczynski M, Reca R, Ratajczak J, Kucia M, Shirvaikar N, Honczarenko M, Mills M, **Wanzeck J**, Janowska-Wieczorek A, Ratajczak MZ. Incorporation of CXCR4 into membrane lipid rafts primes homing-related responses of hematopoietic stem/progenitor cells to an SDF-1 gradient. *Blood*. 2005 Jan 1;105(1):40-8.

Kucia M, Reca R, Miekus K, **Wanzeck J**, Wojakowski W, Janowska-Wieczorek A, Ratajczak J, Ratajczak MZ. Trafficking of Normal Stem Cells and Metastasis of Cancer Stem Cells Involve Similar Mechanisms: Pivotal Role of the SDF-1–CXCR4 Axis. *Stem Cells* 2005;23:93-102
www.StemCells.com